



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**CARACTERÍSTICAS HEMATOLÓGICAS E OCORRÊNCIA DE HEMOPARASITAS EM  
AVES DE RAPINA**

MÁRCIA SOFIA DOS SANTOS BETTENCOURT VIANA

**CONSTITUIÇÃO DO JURÍ**

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da Fonseca de  
Sampaio

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutor Fernando Ribeiro Alves Afonso

Dr. Fernando González González

**ORIENTADOR**

Dr. Fernando González González

**CO-ORIENTADOR**

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

2010

LISBOA

---





UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**CARACTERÍSTICAS HEMATOLÓGICAS E OCORRÊNCIA DE HEMOPARASITAS EM  
AVES DE RAPINA**

MÁRCIA SOFIA DOS SANTOS BETTENCOURT VIANA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**CONSTITUIÇÃO DO JURÍ**

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da Fonseca de  
Sampaio

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutor Fernando Ribeiro Alves Afonso

Dr. Fernando González González

**ORIENTADOR**

Dr. Fernando González González

**CO-ORIENTADOR**

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

2010

LISBOA

---

A todos aqueles, que se tendo cruzado comigo pelo caminho,  
me souberam sorrir.





## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Dr. Fernando González González por todo o apoio, compreensão e amizade, durante todos os meses de trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof. Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho, por toda a sua disponibilidade e apoio, mesmo apesar da distância.

Ao informático Santiago Cano Alsua, da Universidade Complutense de Madrid, pela ajuda inestimável com o tratamento estatístico dos dados.

Ao Prof. Doutor Luís Revuelta Rueda, da Universidade Complutense de Madrid, pela ajuda que tanto necessitei na etapa final deste trabalho.

A toda a equipa do Lx CRAS, em particular ao Dr. Pedro Melo, Dr<sup>a</sup>. Érica Brazio, Nuno Ventinhas e Verónica Bogalho, por ajudarem a manter viva a paixão que partilhamos pelos selvagens e por estarem sempre tão disponíveis a ensinar o que sabem. O que aprendi com vocês foi essencial nesta jornada.

A toda a extraordinária equipa do GREFA, trabalhadores e voluntários, por toda a ajuda em todos os momentos, particularmente à equipa da enfermaria, José Mendoza e Irene López, sem os quais este trabalho não seria possível. Muito obrigada pela vossa amizade, inspiração e ensinamentos.

Ao meu amigo e irmão Marc Isidoro Ayza, por todas as horas inesgotáveis de trabalho no laboratório e pelo incentivo diário. Este trabalho também é teu.

Às duas grandes companheiras de casa que tive, Laura e Diana. Obrigada por serem a minha família nos bons e nos maus momentos e por ajudarem a manter-me sã nas alturas de maior stress. Laura, muito obrigada pela colega, amiga e irmã que foste nos últimos meses deste trabalho e pelo teu apoio incondicional.

A todos os meus amigos, sem os quais não seria capaz de sobreviver. Obrigada por existirem e por fazerem de cada dia um momento especial.

A toda a família Lopes, por terem estado lá desde o principio, ainda que não me tenham acompanhado até ao final. Obrigada por terem feito parte da minha vida e por a terem marcado de forma tão importante.

A toda a minha família, em particular, aos meus pais, irmã, sobrinho e padrinhos. Obrigada por acreditarem em mim e por fazerem de mim quem hoje sou.



**Publicações resultantes deste trabalho:**

Viana, M.B., Madeira de Carvalho, L.M. & González, F.G. (2010). Valores hematológicos de um grupo de Milhafres reais (*Milvus milvus*) mantidos em cativeiro no GREFA. *Congresso de Animais Exóticos e de Zoo da AEFMV, Lisboa, Portugal, 2 e 3 de Outubro de 2010*. (Formato poster)

Este trabalho vai ainda ser apresentado na *11<sup>th</sup> EAAV Conference and 1<sup>st</sup> ECZM Meeting*, a realizar em Madrid, Espanha, entre 26 e 30 de Abril de 2011, em formato de poster sob o título “Blood parameters and haemoparasites occurrence in birds of prey in a rehabilitation center in Spain”.



# CARACTERÍSTICAS HEMATOLÓGICAS E OCORRÊNCIA DE HEMOPARASITAS EM AVES DE RAPINA

## Resumo

A hematologia permite o melhor conhecimento da fisiologia de qualquer espécie animal, sendo uma importante ferramenta de diagnóstico na clínica de fauna selvagem. No entanto, para ser de máxima utilidade é necessário conhecer as diferentes características hematológicas das espécies que se pretendem analisar. Os estudos sobre hematologia e pesquisa de hemoparasitas em aves de rapina, tornaram-se cada vez mais importantes nos últimos anos, especialmente quando relacionados com a gestão e conservação de espécies ameaçadas.

A ocorrência de hemoparasitas tem sido investigada em várias espécies de aves de toda a Europa, no entanto, os estudos sobre hemoprotozoários em aves de rapina realizados em Espanha continuam a ser escassos.

Com o objectivo de estudar as características hematológicas e determinar a prevalência da infecção por hemoparasitas em aves de rapina, realizaram-se análises hematológicas em 191 aves que deram entrada no Hospital de fauna selvagem do Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Habitat (GREFA) em Madrid, Espanha, pertencentes a nove espécies de rapinas diurnas e a cinco espécies de rapinas nocturnas. Neste estudo, foi também analisada a possível relação entre presença/ausência destes parasitas com algumas variáveis analisadas, como a idade, sexo, condição corporal e parâmetros hematológicos.

Foram identificados os géneros *Leucocytozoon* spp., *Haemoproteus* spp., *Plasmodium* spp. e *Trypanosoma* spp. e foram encontradas relações importantes entre esta positividade e as alterações observadas em algumas variáveis analisadas, nomeadamente hematócrito, contagem total de eritrócitos e contagem total de leucócitos. A taxa global de infecção foi de 35,6% (68/191), dos quais 34,4% (56/163) correspondem a aves da ordem Falconiformes e 42,9% (12/28) a aves da ordem Strigiformes.

O significado parasitológico, clínico e epidemiológico destes resultados foi analisado tendo em conta a importância que estes parasitas podem assumir em termos de ecologia e conservação das espécies aves de rapina estudadas, tanto em liberdade como em cativeiro.

Palavras-chave: Características hematológicas, Aves de rapina, GREFA, Hemoparasitas, *Leucocytozoon*, *Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Trypanosoma*.



# HEMATOLOGIC CHARACTERISTICS AND HEMOPARASITES OCURENCE IN BIRDS OF PREY

## Abstract

Hematology allows a better knowledge of physiology of animal species. It has proved to be a valuable diagnostic tool in the wildlife practice. However, to obtain optimum results it is necessary to know the different hematologic characteristics of the species that we want to analyze. Hematology studies and surveys of hemoparasites in birds of prey have become very important in the last years, especially when related to the management and conservation of endangered species.

The incidence of blood parasites has been investigated in several species of birds throughout Europe. In despite, studies about haemoprotozoa in raptors held in Spain are still scarce.

In order to study the hematologic characteristics and to determine the prevalence of blood parasites in birds of prey, hematological tests were carried out in 191 birds admitted to the Wildlife Hospital of Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Habitat (GREFA) in Madrid, Spain, relatives to nine species of diurnal birds of prey and five species of nocturnal birds of prey. This study assessed the possible relationship between the presence/absence of these parasites with some variables, as age, sex, body condition and blood parameters.

*Leucocytozoon* spp., *Haemoproteus* spp., *Plasmodium* spp. and *Trypanosoma* spp. genera were identified and important relations between this positivity and several tested variables, including hematocrit (Hct), total red blood cell count (TRBC) and total white blood cell count (TWBC), were found. The overall rate of infection was 35,6% (68/191), with a global prevalence rate of 34,4% (56/163) in birds of Order Falconiformes and 42,9% (12/28) in birds of Order Strigiformes.

The parasitological, clinical and epidemiological meaning of these results is discussed considering the importance that these parasites reach in terms of ecology and conservation, since they affect both free living and captive populations of the studied raptors species.

Key-words: Hematologic characteristics, Birds of prey, GREFA, Haemoprotozoa, *Leucocytozoon*, *Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Trypanosoma*





<b>Capítulo 1. Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>1</b>
1.1. Introdução	1
1.2. Aves de rapina e sua ecologia	2
1.3. Características hematológicas das aves	6
1.3.1. Eritrócitos	7
1.3.2. Leucócitos	9
1.3.3. Trombócitos	13
1.4. Influências fisiológicas e patológicas nas características hematológicas das aves	14
1.5. Hemoparasitas	18
1.5.1. Ciclo de vida e descrição dos diferentes géneros e formas	19
a) <i>Haemoproteus</i>	19
b) <i>Leucocytozoon</i>	22
c) <i>Plasmodium</i>	23
d) <i>Trypanosoma</i>	28
e) <i>Hepatozoon</i>	29
f) <i>Babesia</i>	30
g) Microfilárias	30
1.5.2. Detecção de Hemoparasitas	31
1.5.3. Patogenia das parasitoses e seu impacto nas aves selvagens	32
1.5.4. Resistência natural e Imunidade	34
<b>Capítulo 2. Desenvolvimento Experimental .....</b>	<b>37</b>
2.1. Objectivos	37
2.2. Material e Métodos	37
2.2.1. Colheita das amostras de sangue	37
2.2.2. Preparação, fixação e coloração do esfregaço sanguíneo	38
2.2.3. Análises hematológicas	39
2.2.4. Identificação dos géneros parasitários	41
2.2.6. Análise estatística	41



<b>Capítulo 3. Resultados e Discussão .....</b>	<b>43</b>
A – Características hematológicas	43
B – Pesquisa de hemoparasitas	50
C – Caso específico dos Peneireiros das torres ( <i>Falco naumanni</i> ) neste estudo	55
<b>Capítulo 4. Conclusões .....</b>	<b>61</b>
<b>Capítulo 5. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>63</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>71</b>
Anexo I	73
Anexo II	75
Anexo III	79
Anexo IV	81
Anexo V	82
Anexo VI	83
Anexo VII	84
Anexo VIII	86



## FIGURAS

---

Figura 1. Vectores do género <i>Haemoproteus</i> .....	19
Figura 2. Diagrama representativo do ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> sp. em aves de rapina .....	25
Figura 3. Diagrama de representação da dinâmica da parasitemia da malária das aves .....	27
Figura 4. Técnica do escorregamento ou de esfregaço em cunha ( <i>Wedge smear technique</i> ) .....	38
Figura 5. Determinação do hematócrito .....	39
Figura 6. Câmara de Neubauer Improved e Regra do <i>L</i> .....	40
Figura 7. Média e desvio padrão dos valores de hematocrito nos diferentes grupos de aves estudados .....	45
Figura 8. Distribuição das aves positivas/negativas a hemoparasitas nas quatro famílias estudadas .....	50
Figura 9. Média e desvio padrão do ratio H/L de acordo com o ano de entrada no GREFA .....	57
Figura 10. Distribuição dos Peneireiros das torres ( <i>Falco naumanni</i> ) positivos/negativos a hemoparasitas consoante o sexo .....	59
Figura 11. Distribuição dos Peneireiros das torres ( <i>Falco naumanni</i> ) positivos/negativos a hemoparasitas consoante a idade .....	59
Figura 12. Distribuição da condição corporal em Peneireiros das torres ( <i>Falco naumanni</i> ) de acordo com a infecção por hemoparasitas .....	60



## TABELAS

---

Tabela 1. Ecologia das aves de rapina estudadas .....	4
Tabela 2. Índice Policromático por avaliação da morfologia eritrocitária .....	8
Tabela 3. Processos patológicos indicados pelas alterações nas concentrações das células hemáticas em aves .....	16
Tabela 4. Valores médios de hematócrito (Hct) e contagem total de eritrocitos (TRBC) por espécie, família e ordem .....	44
Tabela 5. Valores médios de hematócrito (Hct) e contagem total de eritrocitos (TRBC) por grupo de aves .....	46
Tabela 6. Valores médios, mínimos e máximos de TWBC por espécie, família e ordem .....	47
Tabela 7. Valores médios de contagem total de leucócitos (TWBC) por grupo de aves .....	49
Tabela 8. Espécies de hospedeiros, géneros de hemoparasitas encontrados e percentagem de positivos .....	51
Tabela 9. Dados hematológicos da espécie Peneireiro das torres ( <i>Falco naumanni</i> ) .....	55
Tabela 10. Valores do ratio H/L por ano de entrada no GREFA .....	56
Tabela 11. Valores das contagens totais de leucócitos (TWBC) em jovens e adultos de Peneireiro das torres ( <i>Falco naumanni</i> ) .....	58





## LISTA DE ABREVIATURAS

---

CC	condição corporal
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
Hct	Hematocrito
<i>n</i>	Número de indivíduos
PCV	<i>Packed cell volume</i>
ratio H/L	ratio heterófilos/linfócitos
sp.	Species (singular)
spp.	Species (plural)
TRBC	Contagem total de eritrócitos ( <i>Total red blood cell</i> )
TWBC	Contagem total de leucócitos ( <i>Total white blood cell</i> )



### 1.1. Introdução

A hematologia é a disciplina das ciências médicas que estuda o sangue e os tecidos que lhe dão origem, e é actualmente considerada uma parte integrante do diagnóstico clínico laboratorial em medicina das aves (Samour, 2006). Um painel sanguíneo representa o estado actual das células existentes na circulação periférica, dando uma informação geral sobre o estado de saúde do animal. São numerosos os factores que podem influenciar as concentrações e as características hematológicas, o que torna este tipo de análises, um meio complementar de diagnóstico muito sensível mas de baixa especificidade (Samour & Pendl, 2009b). Apesar destas provas raramente permitirem um diagnóstico etiológico, continuam a ser uma ferramenta de diagnóstico indispensável para avaliar o estado de saúde dos indivíduos, monitorizar a evolução de uma doença, avaliar a eficácia de uma terapêutica instituída e proporcionar um prognóstico adequado (Ihedioha, Idika & Ogamba, 2008; Samour, 2006).

Apesar dos numerosos e significativos avanços obtidos nos últimos 10 anos na hematologia das aves (Howlett, 2000), os métodos manuais, muitas vezes demorados e trabalhosos, continuam a representar a melhor opção para avaliar a maioria dos parâmetros hematológicos (Pendl, 2006). No entanto, e principalmente em aves silvestres, é fundamental obter um diagnóstico laboratorial rápido e preciso já que muitas vezes os sinais clínicos não estão directamente relacionados com a gravidade da doença (Hernandez & Margalida, 2010) e o tempo desempenha um papel vital no tratamento e prognóstico do animal (Clark, Boardman & Raidal, 2009; Muller, George & Mannil, 2005; Samour & Pendl, 2009).

A hematologia clínica não é uma ferramenta de diagnóstico relevante apenas em aves domésticas (Van Wyk, van der Bank & Verdoorn, 1998; Clark & Raidal, 2009), demonstrando também ser uma útil fonte de informação em programas de conservação de vida selvagem (Villegas, Sánchez, Costillo & Corbacho, 2002; Hernandez & Margalida, 2010). Nos últimos anos, os estudos sobre hematologia e pesquisa de hemoparasitas em aves de rapina, tornaram-se cada vez mais importantes, especialmente quando relacionados com a gestão e conservação de espécies ameaçadas (Limiñana, López-olvera, Gallardo, Fordham & Urios, 2009; Tomé, Santos, Cardia, Ferrand & Korpimäki, 2005).

Os hemoparasitas são tradicionalmente considerados pouco patogénicos em aves selvagens (Valkiūnas, 2005) provavelmente devido à dificuldade em descobrir as causas de morte ou efeitos sub-letais neste tipo de animais (Tomé *et al.*, 2005). No entanto, alguns autores relataram, casos de mortalidade em conjunto com outras condições debilitantes,

diminuições de taxas reprodutivas e efeitos na adaptabilidade dos hospedeiros provocadas por estes parasitas (Korpimäki, Hakkarainen & Bennet, 1993; Tomé *et al.*, 2005).

Numerosos estudos, realizados um pouco por toda a Europa, têm investigado a prevalência de hemoparasitas em várias espécies de aves de rapina que, pela sua posição no topo da cadeia alimentar desempenham um papel muito importante na manutenção do equilíbrio dos ecossistemas que ocupam (Krone, Waldenstöm, Valkiūnas, Lessow, Müller, Iezhova, Fickel & Bensch, 2008). Porém, e após a revisão bibliográfica realizada, constatou-se que os estudos sobre hemoprotozoários em aves de rapina realizados na Península ibérica e particularmente em Espanha, continuam a ser escassos. Foi com esta perspectiva que se delineou como principais objectivos deste trabalho a identificação dos géneros de hemoprotozoários e as associações parasita-hospedeiro existentes na população estudada, a determinação da sua prevalência e a avaliação de algumas variáveis, tanto clínicas (idade, sexo, condição corporal) como hematológicas.

Este estudo foi realizado em 191 aves de rapina que foram hospitalizadas no hospital de fauna selvagem do *Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Habitat* (GREFA), Madrid, Espanha (40° 28'06.37 N, 3° 50'25.87 O), entre os meses de Outubro de 2009 e Março de 2010 e incluiu aves em recuperação, aves irrecuperáveis (cuja condição física ou comportamental não permite a sua libertação) e aves pertencentes a projectos de cria em cativeiro, provenientes de toda a Comunidade de Madrid. As análises hematológicas do sangue colhido e a pesquisa de hemoparasitas foram realizadas nas instalações laboratoriais do GREFA.

Durante o período de estágio pude participar na dinâmica diária de funcionamento do centro, assistindo a casos clínicos no hospital de fauna selvagem, colaborando em cirurgias, necrópsias e outros estudos *post-mortem*, na realização das diversas técnicas de hematologia, bioquímica, microbiologia e parasitologia levadas a cabo nos laboratórios do GREFA e em todas as actividades de recuperação, cria em cativeiro e reabilitação. Durante este período tivemos ainda a oportunidade de elaborar um seminário de formação interna para os voluntários e trabalhadores do GREFA, intitulado “El Valor de la Hematología en la Clínica Aviar”.

## **1.2. Aves de rapina e sua ecologia**

O termo “aves de rapina” é utilizado para designar as aves das Famílias Falconidae (falcões), Accipitridae (abutres, águias, milhafres e outros), Strigidae e Tytonidae (mochos e corujas) que compartilham características semelhantes, nomeadamente garras e bicos fortes e visão de longo alcance (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade,

2007; Santos, Pereira, Melo & Madeira de carvalho, 2008). O termo “rapina” deriva da palavra latina “*rapere*” que significa o acto de roubar com violência ou tomar à força, relacionado com a forma de obtenção de alimento de algumas aves predadoras.

Na realidade, desde o ponto de vista zoológico, as rapinas diurnas e nocturnas são espécies muito diferentes, pertencentes a grupos taxonómicos distintos, nomeadamente às ordens Falconiformes e Strigiformes, respectivamente (Martínez & Calvo, 2006). A caça activa exige uma adaptação especial, estando os Falconiformes (rapinas diurnas) e Strigiformes (rapinas nocturnas) preparados principalmente no que diz respeito às modificações das patas, que representam grande parte da sua massa corpórea. A presença de bico reforçado está relacionada ao acto de rasgar a pele de suas presas, sejam mamíferos ou outros vertebrados, apesar de também ser útil para matar, como acontece em alguns falcões (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2007). A posição frontal dos olhos de algumas aves de rapina também é resultado de uma adaptação à caça, formando uma visão binocular útil na localização das presas. A resolução visual nos falcões e águias é duas vezes maior do que na espécie humana, permitindo a definição de imagens a grandes distâncias (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2007).

Os Falconiformes apresentam grande diversidade morfológica e de massa corporal. A variação do formato das asas está geralmente relacionada com o habitat e tipo de voo e o dimorfismo sexual está principalmente relacionado com o tamanho (fêmeas maiores), sendo bastante pronunciado nas espécies do género *Accipiter*.

A ordem Strigiforme é composta por espécies predominantemente nocturnas, caracterizadas pela presença de um bico forte, olhos frontais, audição extremamente apurada e rémiges com estrutura especial que possibilita um voo silencioso, que não interfere na orientação acústica durante a caça e não permite a detecção do predador pela presa (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2007; Martínez & Calvo, 2006). A localização frontal dos olhos apesar de proporcionar uma visão binocular, diminui o campo de visão periférica, compensado pela capacidade de girar a cabeça em até 270° (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2007). Tal como acontece noutros animais de hábitos nocturnos, os olhos destas aves possuem uma camada de células localizada atrás da retina, designada *tapetum lucidum* que reflecte a luz sobre os bastonetes, possibilitando uma melhor captação de luz. Características como a presença de ouvidos posicionados assimetricamente no crânio e disco facial, possibilitam a exacta localização da presa apenas através do som emitido

As aves de rapina, tanto diurnas como nocturnas, têm em comum o facto de contar com populações geralmente reduzidas e frequentemente ameaçadas. Em condições naturais, o baixo número de indivíduos com que contam estas espécies, é uma circunstância derivada da sua posição nas redes tróficas (enquanto predadores), no entanto, na maioria dos casos

a redução das populações é explicada por outras causas, relacionadas com a relação conflituosa que os seres humanos têm com este grupo de aves: destruição de habitats naturais, contaminação com biocidas e venenos, caça furtiva e espólio de ovos e crias (Martínez & Calvo, 2006).

Neste trabalho foram analisados animais pertencentes a 14 espécies de aves de rapina da fauna ibérica, com entrada no hospital de fauna selvagem do GREFA ou pertencentes a programas de cria em cativeiro (ver fotos em anexo – Anexo I). Os aspectos da alimentação e habitat das espécies de aves incluídas neste estudo, podem ser importantes para explicar a exposição aos vectores responsáveis pela transmissão de hemoparasitas. Aspectos importantes da sua ecologia, considerados relevantes para o desenvolvimento deste trabalho, foram resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Ecologia das aves de rapina estudadas.

Espécie	Habitat	Alimentação	Conduta social
Águia-real ( <i>Aquila chrysaetos</i> )	Ocupa uma grande variedade de habitats e mostra uma certa preferência por paisagens abertas, tipicamente montanhosas, evitando áreas florestais extensas. Na Comunidade de Madrid ocupa exclusivamente os relevos do Sistema Central e zonas periféricas. (Ferguson-Lee & Christie, 2004; Madroño, González & Atienza, 2005)	Amplo espectro trófico. Mamíferos (lagomorfos) e aves, principalmente de tamanho mediano (pombas e perdizes). Em algumas regiões, alimenta-se de répteis e ocasionalmente anfíbios, peixes e mesmo até insectos. Consome carcaças de cadáveres especialmente no inverno. (Ferguson-Lee & Christie, 2004)	Solitária ou em pares. A cria ocorre entre casais solitários, mas em raras ocasiões podem ser observados trios. Podem formar pequenos grupos de migração e em zonas de descanso no inverno (Ferguson-Lee & Christie, 2004).
Águia de Bonelli ( <i>Aquila fasciata</i> )	Habitats áridos e semi-húmidos, preferindo montanhas baixas, pequenas colinas, agrupamentos rochosos com muitas falésias e planícies. Alguns casais criam sobre árvores, especialmente no sul e oeste peninsular (Ferguson-Lee & Christie, 2004; Madroño, González & Atienza, 2005).	Aves pequenas e de tamanho médio, principalmente a Perdiz comum ( <i>Alectoris rufa</i> ), alguns lagartos e ocasionalmente insectos. Raramente tem comportamento necrófago. (Ferguson-Lee & Christie, 2004)	Ave solitária, observada por vezes em pares (Ferguson-Lee & Christie, 2004).
Águia Cobreira ( <i>Circaetus gallicus</i> )	Ocupam tipicamente terrenos acidentados e secos, com árvores dispersas ou olivais e por vezes florestas, pastagens áridas e encostas rochosas (Ferguson-Lee & Christie, 2004).	Alimenta-se principalmente de serpentes e alguns lagartos. Ocasionalmente caça pequenos mamíferos (musaranhos, ratos, coelhos e lebres) e anfíbios e muito raramente caça aves e invertebrados (Ferguson-Lee & Christie, 2004).	Geralmente observada sozinha ou em pares, por vezes migra em pequenos grupos de 10-12 indivíduos (Ferguson-Lee & Christie, 2004).
Abutre Negro ( <i>Aegypius monachus</i> )	Ocupa principalmente terrenos abertos em zonas de colina e montanhas, como prados e florestas alpinas, bosques abertos e encostas cobertas de matagal. Nidifica em bosques, escolhendo sempre zonas remotas e tranquilas e constrói o ninho em árvores (Ferguson-Lee & Christie, 2004; Madroño, González & Atienza, 2005).	Ave exclusivamente necrófaga. Prefere cadáveres de médias a grandes dimensões. Raramente captura presas vivas. Em Espanha alimenta-se basicamente de mamíferos, como coelhos e ovelhas, mas insectos e lagartos também fazem parte da sua dieta (Birdlife Internacional, 1996)	Solitário ou em casal, forma ocasionalmente pequenos grupos nos pontos de alimentação e de dormida. Pode criar em solitário, mas normalmente fá-lo em núcleos ou colónias (Birdlife Internacional, 1996, Ferguson-Lee & Christie, 2004).

Tabela 1. Continuação.

Grifo ( <i>Gyps fulvus</i> )	Necessita encostas íngremes ou outros agrupamentos rochosos para criar e dormir, mas procura alimento numa grande variedade de terrenos, desde cultivos de terras baixas e estepes, até planaltos e encostas montanhosas (Ferguson-Lee & Christie, 2004).	Ave exclusivamente necrófaga. A sua alimentação baseia-se numa grande variedade de cadáveres de mamíferos, tanto espécies silvestres como espécies domésticas (gado, particularmente, ovelhas, cabras e bovídeos) (Del Hoyo, Elliott & Sargatal, 1994)	De solitário a gregário: caça sozinho mas dorme socialmente e nidifica em colónias (Ferguson-Lee & Christie, 2004; García-Ripollés, López-López, García-López, Aguilar & Verdero, 2005; Parra & Tellería, 2004).
Milhafre Real ( <i>Milvus milvus</i> )	O habitat típico durante a cria é uma paisagem mista de áreas amplas e abertas onde procura alimento e árvores adequadas para nidificar. Em Espanha a população reprodutora está muito associada a áreas de pastagem ou cultivo extensivos de cereais, evitando os bosques extensos, os cultivos arbóreos e as áreas de regadio (Madroño, Gonsález & Atienza, 2005).	Muito variada, dependendo da disponibilidade. Alimenta-se de muitos cadáveres, mamíferos e aves pequenas (incluindo ovos e crias), répteis, anfíbios e invertebrados. Existe uma tendência à especialização individual ou populacional (Ferguson-Lee & Christie, 2004).	Espécie muito associada a actividades humanas (lixeiros, esterqueiras, quintas, estradas e de forma geral, qualquer tipo de fonte de alimento de origem humana). É das aves de rapina mais sociáveis, reunindo-se em grandes grupos para dormir no Inverno ou em redor de fontes de alimento abundante (Ferguson-Lee & Christie, 2004; Madroño, Gonsález & Atienza, 2005).
Águia de asa redonda ( <i>Buteo buteo</i> )	Habitats florestais integrados ou fragmentados por zonas abertas, zonas de cultivo ou pastagens. É mais comum em terras baixas mas também é habitual em serras e terras altas com árvores, assim como em encostas rochosas. Por vezes nidifica em saliências de falésias. (Del Hoyo <i>et al.</i> 1994; Ferguson-Lee & Christie, 2004).	Grande variedade de vertebrados e invertebrados, sendo as presas mais características os pequenos vertebrados. Os mamíferos pequenos são principalmente roedores e coelhos, mas também lebres, ratos do campo, musaranhos, ratazanas, esquilos e doninhas (Del Hoyo, 1994; Ferguson-Lee & Christie, 2004).	Geralmente solitário ou em pares. Caça quase sempre sozinho e os indivíduos das populações sedentárias dormem normalmente sozinhos ou no máximo em pares ou grupos familiares (Ferguson-Lee & Christie, 2004).
Peneireiro das torres ( <i>Falco naummani</i> )	Prefere zonas secas e abertas, com abundância de insectos e um clima cálido. Costuma evitar os habitats húmidos e com muita vegetação: cria em estepes e planícies, a maioria perto ou dentro de aldeias ou em outras áreas urbanas, incluindo igrejas e catedrais de localidades ou mesmo cidades (Ferguson-Lee & Christie, 2004).	Alimenta-se basicamente de insectos e de pequenos vertebrados (lagartos, mamíferos e passeriformes pequenos, crias e raramente anfíbios) que captura em ambientes abertos (Ferguson-Lee & Christie, 2004; Madroño, Gonsález & Atienza, 2005)	Ave de rapina colonial. Cria em colónias de até 250 casais, por vezes misturadas com o Peneireiro comum. Em Espanha caça em bandos com creca de 40 indivíduos, mas podem formar grupos de caça de até 1000 indivíduos (Andrés & Munera, 2001; Ferguson-Lee & Christie, 2004)
Peneireiro comum ( <i>Falco tinnunculus</i> )	Ampla variedade de habitats, desde estepes a localidades e cidades e de terras baixas a montanhas, evitando zonas boscosas densas. As maiores densidades populacionais são observadas em terrenos de cultivo. Muitas vezes observado em cidades, onde pode nidificar (Ferguson-Lee & Christie, 2004; Madroño, Gonsález & Atienza, 2005)	Grande variedade de presas e elevado grau de oportunismo: com frequência depreda pequenos mamíferos, aves pequenas (principalmente passeriformes), répteis (sobretudo lagartos) e insectos, sendo que qualquer um pode dominar a sua dieta (Ferguson-Lee & Christie, 2004).	Na maioria dos casos encontra-se solitário, em pares ou em grupos familiares, mas por vezes migra em grupos com cerca de 10 indivíduos. Podem formar-se pequenos grupos em locais com abundância de alimento (Ferguson-Lee & Christie, 2004).
Coruja das torres ( <i>Tyto alba</i> )	Associada a biótopos abertos, como pastagens ou terrenos agrícolas, ou semi-abertos, como montados pouco densos. Pouco frequente em zonas arbóreas densas. Nidifica em cavidades nas árvores ou edifícios, fendas de rochas e pedreiras (ICNB, 2004b)	Alimenta-se sobretudo de pequenos mamíferos e também pequenos pássaros, répteis, anfíbios, peixes e insectos. Existem ocorrências de canibalismo entre irmãos (ICNB, 2004b).	Ave solitária e territorial, com elevado grau de antropofilia (ICNB, 2004b).



Tabela 1. Continuação.

Bufo Real ( <i>Bubo bubo</i> )	Zonas de topografia irregular, principalmente com zonas de paredes rochosas (zonas principais de nidificação) junto a zonas arborizadas densas e próximas a cursos de água. Também coberturas de floresta mediterrânea e pastagens. Preferem áreas de pouca ocupação humana ou topograficamente inacessíveis (ICNB, 2004a; Ortego, 2007)	Predador generalista. Em zonas mediterrâneas alimenta-se principalmente de coelhos, mas também de outros pequenos mamíferos, aves e com menos frequência de aves de rapina, répteis, anfíbios, peixes e cadáveres (Donazar, 1989; Donazar, Hiraldo, Delibes & Estrella, 1989; ICNB, 2004a; Serrano, 2000)	Sedentário e fortemente territorial durante todo o ano. Costumam formar casais que se mantêm estáveis todo o ano. Se o habitat é favorável, os casais podem estar relativamente próximos uns dos outros (Mikkola, 1995).
Mocho galego ( <i>Athene noctua</i> )	Associado a terrenos agrícolas e florestas ou bosques, onde nidifica principalmente em buracos nas árvores, mas também em cavidades existentes em rochas e em buracos no solo (Tomé, Bloise & Korpimäki, 2004)	Alimenta-se preferencialmente de pequenos mamíferos (ratos) e invertebrados (insectos) e em menor quantidade de pequenas aves (Tomé, Catry, Bloise & Korpimäki, 2008)	Espécie territorial. Aparentemente os casais mantêm-se por toda a vida de ambos os indivíduos. (Mikkola, 1995; Zuberogoitia, Zabala, Martínez, Hidalgo, Martínez, Azkona & Castillo, 2007).
Coruja do mato ( <i>Strix aluco</i> )	Espécie claramente florestal, contudo pode, esporadicamente, aparecer em parques e jardins extensos (Mikola, 1995).	Alimenta-se de pequenos mamíferos como o rato de campo, murganhos e coelhos e de pequenas aves passeriformes (López-Gordo <i>et al.</i> , 1977).	Os casais permanecem no território onde nidificam durante todo o ano e permanecem juntos durante toda a vida (Mikkola, 1995).
Bufo pequeno ( <i>Asio Otus</i> )	Zonas de bosques pequenos ou mais frondosos. Preferencialmente mosaicos de bosque rodeados por zonas mais abertas onde normalmente possui as suas zonas de caça (Mikola, 1995).	Nos ecossistemas mediterrâneos o rato do campo é a presa principal. Outros pequenos mamíferos como o rato silvestre e o murganho fazem parte da sua alimentação. As aves, têm um papel pouco importante na sua alimentação (García-González & Ortí, 2001).	Os indivíduos invernantes costumam formar grupos que descansam durante o dia no mesmo lugar (Mikola, 1995)

### 1.3. Características hematológicas das aves

O sangue é um fluído não-newtoniano, isto é, um fluído cujas propriedades de fluxo não são descritas por um valor constante de viscosidade, variando a mesma de acordo com o grau de deformação aplicado (Pinheiro, 2008). É constituído por um conjunto de partículas (os constituintes celulares) suspensas em plasma (Smith, West, & Jones, 2000) e representa entre 6 a 12 ml/100 g de peso vivo, ou seja, aproximadamente 6-12% de peso vivo (Campbell, 1995; Coles, 1997), variando consoante a espécie. O volume total de sangue de uma ave diminui de 12% a 6,5%, aproximadamente, com o aumento da idade e é mais elevado em machos do que em fêmeas (Fromont, 1993). Os trabalhos desenvolvidos por Bond e Gilbert (1958) evidenciaram ainda que este volume está também dependente da acção de hormonas esteróides, sendo que a administração de estrogéneos a machos ou de androgéneos a aves castradas provoca o seu aumento.

A tolerância à perda de sangue nas aves é bastante superior à dos mamíferos (Fromont, 1993). Kovách, Szász e Pilmayer (1969) demonstraram mesmo, em várias espécies

domésticas, não ocorrerem casos de mortalidade até 35-50% do volume de sangue total ser extraído. No entanto, e apesar de no caso das aves o baço não funcionar como um reservatório de eritrócitos, estes animais demonstraram recuperar rapidamente de perdas de sangue induzidas experimentalmente.

O sangue de todas as aves é constituído por eritrócitos, leucócitos e trombócitos (Samour & Pendl, 2009a). Em contraste com o que acontece no caso dos mamíferos, as células maduras de cada uma destas linhas celulares retêm o núcleo durante todo o tempo de vida da célula.

Devido à sua adaptação a ambientes extremamente diferentes, desde florestas tropicais a desertos, mares e montanhas, não é de surpreender o facto de existirem numerosas diferenças fisiológicas que podem estar reflectidas nas características hematológicas de cada uma destas espécies. No entanto, as características hematológicas espécie-específicas, não foram ainda descritas para a maioria das espécies aviares, pelo que a idiosincrasia de cada uma destas espécies continua largamente desconhecida (Clark *et al.*, 2009).

### **1.3.1. Eritrócitos**

Os eritrócitos maduros das aves são células elípticas e nucleadas, com um núcleo oval em posição central e citoplasma homogeneamente eosinofílico (Campbell, 1995; Campbell, 2004a; Clark *et al.*, 2009; Fudge, 2000; Samour & Pendl, 2009a; Wernery *et al.*, 2004) (ver fotos em anexo - Anexo II). A cromatina nuclear apresenta-se uniformemente agregada e torna-se cada vez mais condensada com a idade (Campbell, 1995; Campbell, 2004a). A forma oval destas células varia consoante as espécies, exibindo algumas delas, células claramente arredondadas enquanto outras apresentam células com formas mais estreitas e alongadas (Clark *et al.*, 2009).

Os eritrócitos das aves são normalmente maiores que os eritrócitos dos mamíferos, no entanto, a sua dimensão pode variar de espécie para espécie (Campbell, 2004; Clark *et al.*, 2009; Wernery *et al.*, 2004). Trabalhos realizados por Polo, Celadrán, Peinado, Viscor e Palomeque (1992) permitiram concluir que as dimensões dos eritrócitos eram uniformes em quatro espécies de rapinas estudadas e ligeiramente maiores do que os eritrócitos da maioria das outras espécies. Outros autores observaram que o número de eritrócitos em falconiformes se encontrava no limite mínimo do intervalo de  $1.9-5.0 \times 10^6$  células/ $\mu$ l para a generalidade das aves e concluíram que, com um menor número de eritrócitos e hematocrito similar, o tamanho dos eritrócitos das aves de rapina deve ser maior (van Wyk *et al.*, 1998). De uma forma geral, a dimensão dos eritrócitos aviares varia dentro do intervalo  $10.7 \times 6.1 \mu\text{m}$  a  $15.8 \times 10.2 \mu\text{m}$  (Campbell, 2004a).

Para além dos típicos eritrócitos maduros que constituem o tipo de célula predominante num esfregaço sanguíneo de uma ave clinicamente saudável, podem ser observadas outras células menos numerosas e que representam diferentes estágios do desenvolvimento eritrocitário (Clark *et al.*, 2009). Os eritrócitos policromáticos são células imaturas que se caracterizam por apresentarem uma forma menos elíptica e núcleo menos condensado que os eritrócitos maduros (Bounous, 2003; Campbell, 2004a; Samour e Pendl, 2009a) e pelo facto do seu citoplasma apresentar uma coloração mais pálida e mais basofílica devido à elevada quantidade de RNA ribossomal (Clarck *et al.*, 2009). O índice de eritrócitos policromáticos existentes no sangue periférico de uma ave é uma indicação da regeneração eritrocitária (Wernery *et al.*, 2004). Em aves adultas saudáveis, estas células constituem entre 1-10% da totalidade dos eritrócitos (Samour & Pendl, 2009a), no entanto, o índice de policromasia aumenta quando ocorre um aumento da eritropoiese em resposta a uma situação de anemia regenerativa. O índice de policromasia pode ser classificado de acordo com os valores apresentados na Tabela 2, tendo em conta que a uma contagem de 2-10 células policromáticas por campo de imersão em monocamada, corresponde uma percentagem de 1-10%.

Tabela 2. Índice Policromático por avaliação da morfologia eritrocitária (Samour & Pendl, 2009a).

Índice	[%]	Impressão geral	Critério morfológico	Interpretação
1	0	Homogénea	Eritrócitos homogéneos em forma e estrutura; poucas ou nenhuma células policromáticas.	Fisiológico ou suspeita de desvio à direita; Depressão da eritropoiese.
2	< 10	Ligeiramente irregular	Algumas células policromáticas.	Fisiológico.
3	10-20	Moderadamente irregular	Células policromáticas vistas regularmente.	Desvio à esquerda ligeiramente regenerativo; Eritropoiese ligeiramente aumentada.
4	20-50	Claramente irregular	Quantidade considerável de células policromáticas; Ligeira poiquilocitose.	Desvio regenerativo a degenerativo à esquerda; Eritropoiese aumentada.
5	> 50	Bastante irregular	Grande quantidade de células policromáticas; Poiquilocitose considerável.	Desvio degenerativo à esquerda severo; Eritropoiese bastante aumentada.

Os reticulocitos são eritrócitos que representam o penúltimo estágio de maturação desta população celular (Campbell, 1995; Campbell, 2004a) e que, quando corados com uma coloração vital como o novo azul de metileno, exibem agregações granulares de RNA (*reticulum*) (Clark, 2009; Fudge, 2000). Quando corados desta maneira, é evidente a existência de alguma quantidade residual de RNA citoplasmático na maioria dos eritrócitos. Como consequência, o termo “reticulocito” deveria estar reservado para as células com *reticulum* agregado, formando um anel distinto mas incompleto ao redor do núcleo (Clark *et al.*, 2009). O número destas células normalmente está correlacionado com o número de eritrócitos policromáticos num esfregaço sanguíneo (Campbell, 1995; Campbell, 2004a; Clark *et al.*, 2009) e a sua presença no sangue periférico de uma ave normal sugere que os últimos estágios de maturação dos eritrócitos ocorrem na circulação sanguínea. Em situações de respostas regenerativas muito marcadas podem ser vistas formas redondas imaturas de eritrócitos, designadas por rubricitos (Campbell, 1995).

Diferentes variações dos típicos eritrócitos são ocasionalmente vistas na corrente sanguínea (Campbell, 2004a). A forma pode variar de redonda a alongada, passando por numerosas formas alteradas designadas colectivamente por poiquilocitos (Clark *et al.*, 2009) (ver fotos em anexo – Anexo II). A sua presença pode representar apenas um artefacto de preparação do esfregaço sanguíneo, que resulta na destruição e dano de uma grande percentagem de células ou, por outro lado, pode indicar a existência de uma afecção da medula óssea por uma infecção sistémica severa (Fudge, 2000). A relação existente entre a presença deste tipo de células com formas variáveis e situações de ocorrência de doença está, no entanto, pior documentada em aves do que em mamíferos (Clark *et al.*, 2009).

### **1.3.2. Leucócitos**

Existem cinco tipos de leucócitos no sangue das aves, nomeadamente: heterófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monocitos. Os três primeiros tipos possuem grânulos citoplasmáticos distintos e, como tal, podem ser colectivamente designados por granulocitos (Clark *et al.*, 2009; Campbell, 1994; Campbell, 2004a). Além disso, como os grânulos citoplasmáticos predominantes nos heterófilos e eosinófilos apresentam afinidade por colorações ácidas, estes dois tipos de populações celulares podem ser designados conjuntamente por acidófilos (Clark *et al.*, 2009). Os linfócitos e monócitos, por sua vez, podem ser designados por agranulocitos ou células mononucleares (Campbell, 2004b).

Em muitas espécies de aves, os heterófilos são os granulocitos mais encontrados (Clark *et al.*, 2009) e frequentemente, são mesmo os leucócitos mais comuns no sangue periférico de algumas espécies (Campbell, 1995; Clark *et al.*, 2009). Quando examinados em esfregaços

sanguíneos corados com colorações Romanowsky, estas células caracterizam-se por apresentarem uma forma redonda irregular, grânulos citoplasmático acidófilos e bastante proeminentes e núcleo lobulado e basofílico (Clark *et al.*, 2009; Samour & Pendl, 2009a) (ver fotos em anexo – Anexo II). O núcleo dos heterófilos maduros normalmente apresenta 2 ou 3 lóbulos (Bounous, 2003, Campbell, 1995; Campbell, 2004a, Campbell, 2004b), sendo o número médio de lóbulos descrito em galinhas aproximadamente 2.44 (Lucas & Jamroz). O citoplasma destas células é incolor e sem vacúolos (Campbell, 1994) e contém grânulos bastante robustos com forma de bastonete (Bounous, 2003; Campbell, 1994; Campbell, 1995; Campbell, 2004a; Campbell, 2004b; Coles, 1997). Estes grânulos normalmente distribuem-se de forma uniforme pelo citoplasma, e consoante a sua densidade podem obscurecer a maioria do citoplasma e algumas vezes também o núcleo (Bounous, 2003; Clark *et al.*, 2009).

Os heterófilos das aves são considerados funcionalmente equivalentes aos neutrófilos dos mamíferos (Brooks, Bounous & Andreasen, 1996; Campbell, 2004a). Fazem parte da resposta imunitária inata (Samour & Pendl, 2009b), participando activamente em respostas inflamatórias e na fagocitose de microrganismos, restos celulares e materiais estranhos (Campbell, 2004a; Samour & Pendl, 2009b). Para além disto, os grânulos citoplasmáticos dos heterófilos contêm lisozima e proteínas necessárias à sua actividade bactericida (Campbell, 2004a). Um estudo realizado em galinhas, com o intuito de comparar as funções dos heterófilos das aves com os neutrófilos humanos e caninos, demonstrou que apesar dos heterófilos apresentarem uma actividade bactericida semelhante, a sua resposta fagocitária e oxidativa, é menor que a dos neutrófilos (Brooks *et al.*, 1996).

Os eosinófilos são o segundo tipo de granulocitos acidófilos encontrados no sangue das aves. São células tipicamente redondas mas com uma maior tendência para a irregularidade que os heterófilos (Campbell, 1995). O seu citoplasma cora de um azul claro e pálido e apresenta grânulos eosinofílicos redondos e mais brilhantes que os dos heterófilos devido à elevada concentração de arginina (Campbell, 1994; Campbell, 1995) (ver fotos em anexo – Anexo II). A sua aparência varia bastante entre as diferentes espécies e em alguns casos o termo “eosinófilo” chega mesmo a ser impróprio já que os grânulos citoplasmáticos não são eosinofílicos, podendo apresentar uma coloração acastanhada, cinzenta ou azul pálida (Campbell, 2004a; Clark *et al.*, 2009; Samour & Pendl, 2009a). O núcleo é tipicamente lobulado e composto por cromatina basofílica escura e grosseiramente agregada. Normalmente apresenta 2 lóbulos, sendo o valor médio de 1.97 descrito em eosinófilos de galinhas (Lucas & Jamroz, 1961).

A função dos eosinófilos das aves é ainda muito pouco conhecida nos dias que correm. Observações clínicas parecem sugerir que um número aumentado de eosinófilos pode estar relacionado com a ocorrência de trauma tissular e dermatopatias por auto-mutilação,

acidentes de voo, ataques de carnívoros, injeções e recuperações *post* cirúrgicas (Samour & Pendl, 2009b), no entanto, experimentalmente parece não existir nenhum tipo de correlação entre reacções parasitárias e/ou anafiláticas com a existência de eosinofílas em aves. Segundo Wernery *et al.* (2004), mesmo em falcões com uma elevada carga parasitária, os esfregaços sanguíneos demonstraram uma total ausência de eosinófilos.

Os basófilos normais das aves são tipicamente os granulocitos mais pequenos existentes na circulação periférica (Fromont, 1993). Caracterizam-se por apresentarem uma forma redonda irregular (Clark *et al.*, 2009), citoplasma incolor com grânulos extremamente basofílicos (Campbell, 1994; Clark *et al.*, 2009) e núcleo não lobulado frequentemente obscurecido pela elevada concentração de grânulos citoplasmáticos (Campbell, 2004b; Wernery *et al.*, 2004) (ver fotos em anexo – Anexo II). Estes grânulos são frequentemente afectados por colorações de base alcoólica, como as colorações de Romanowsky, nas quais se dissolvem ou coalescem acabando por aparecer como formas anormais nos esfregaços sanguíneos (Campbell, 1994; Campbell, 1995; Campbell, 2004a; Campbell, 2004b; Clark *et al.*, 2009; Fromont, 1993). O núcleo normalmente apresenta uma coloração pálida comparativamente à generalidade dos grânulos presentes no citoplasma (Clark *et al.*, 2009) e a inexistência de lobulação faz com que estas células se assemelhem aos mastócitos dos mamíferos. Os basófilos das aves são frequentemente encontrados na circulação periférica, em contraste com os basófilos dos mamíferos, raramente identificados em esfregaços sanguíneos de animais saudáveis (Campbell, 2004a).

A sua função ainda não está totalmente clarificada mas acredita-se ser semelhante à dos basófilos e dos mastócitos dos mamíferos, já que os seus grânulos citoplasmáticos contêm histamina (Campbell, 2004a; Fromont, 1993). Parecem também estar associados a reacções inflamatórias e de hipersensibilidade tipo IV (Campbell, 2004a) e tal como acontecia com os eosinófilos, observações clínicas parecem indicar a existência de uma correlação com trauma tissular grave (Samour & Pendl, 2009b).

Os linfócitos são as células mononucleares mais comuns no sangue periférico das aves (Clark *et al.*, 2009), e em algumas espécies são mesmo os leucócitos mais numerosos (Campbell, 1995). Morfologicamente os linfócitos maduros são células tipicamente redondas que frequentemente se moldam em torno das células adjacentes existentes no esfregaço sanguíneo (Campbell, 1994; Campbell, 1995; Samour & Pendl, 2009a). Podem ser divididos em linfócitos pequenos, médios e grandes de acordo com o seu tamanho (Clark *et al.*, 2009; Wernery *et al.*, 2004) sendo que a maioria dos linfócitos normais existentes na circulação periférica são linfócitos pequenos e médios com um núcleo redondo, ocupando uma posição central (Campbell, 1995; Wernery *et al.*, 2004). A cromatina nuclear é densamente agregada ou reticulada e o citoplasma é normalmente homogéneo e basofílico (Campbell, 2004a; Wernery *et al.*, 2004; Samour & Pendl, 2009) (ver fotos em anexo – Anexo II). A quantidade

de citoplasma varia desde uma pequena banda ao redor do núcleo nos linfócitos pequenos, a uma banda moderadamente larga nos linfócitos médios e grandes (Wernery *et al.*, 2004). Os linfócitos grandes são células tipicamente maiores que os granulócitos, com um núcleo redondo ou oval composto por cromatina moderadamente densa e irregularmente condensada e citoplasma moderadamente basofílico (Clark *et al.*, 2009). Apesar de existirem frequentes variações na morfologia destas células no sangue de um indivíduo, não existem diferenças significativas na morfologia dos linfócitos entre diferentes espécies (Clark *et al.*, 2009).

Nas Aves, a linfopoiese ocorre a nível da Bolsa Fabricius e tal como acontece nos mamíferos, os linfócitos estão principalmente implicados na resposta imunitária adquirida (Fromont, 1993; Wernery *et al.*, 2004). São divididos em dois grupos funcionais: linfócitos T, responsáveis pela imunidade mediada por células e linfócitos B, responsáveis pela produção de imunoglobulinas e outros mediadores celulares (Fromont, 1993; Samour & Pendl, 2009b; Wernery *et al.*, 2004).

Os monócitos das aves são leucócitos grandes e pleomórficos (Campbell, 1995; Clark *et al.*, 2009). O seu núcleo é composto por uma cromatina reticular delicada, com aspecto rendilhado (Campbell, 1995) e tem uma forma muito variável, podendo ser redondo, oval, bilobado, indentado (reniforme) ou com forma irregular (Campbell, 2004a; Clark *et al.*, 2009) (ver fotos em anexo – Anexo II). Possuem um citoplasma abundante, com um aspecto granular fino e uma coloração azul/acinzentada, podendo algumas células ocasionalmente apresentar vacúolos (Campbell, 2004a; Samour & Pendl, 2009a) e pequenos grânulos eosinofílicos (Campbell, 1995; Clark *et al.*, 2009). Normalmente é possível distinguir duas zonas citoplasmáticas: uma área mais clara adjacente ao núcleo e uma área mais escura na periferia (Campbell, 2004a). Tal como acontecia com os linfócitos, apesar de existirem diferenças morfológicas nos monócitos do sangue de um indivíduo, não existem diferenças significativas nos monócitos de diferentes espécies de aves (Clark *et al.*, 2009).

Os monócitos e os linfócitos grandes podem ser difíceis de distinguir num esfregaço sanguíneo devido ao facto de possuírem dimensões e características morfológicas muito semelhantes (Campbell, 2004a). Mesmo para um examinador experiente a distinção entre estas duas populações celulares nem sempre é possível (Samour & Pendl, 2009a). De uma forma geral, os principais critérios para diferenciar estas células são: a forma da célula (redonda e regular nos linfócitos e muito variada nos monócitos), a forma do núcleo (redonda ou oval nos linfócitos e muito variada nos monócitos, sendo a forma mais comum a forma de rim), a posição do núcleo (normalmente central nos linfócitos e quase sempre excêntrica nos monócitos), a estrutura do núcleo (cromatina com agregados grosseiros nos linfócitos grandes e pequenos agregados integrados no reticulum nuclear nos monócitos), a estrutura do citoplasma (relativamente homogéneo e sem vacúolos nos linfócitos e

heterogéneo, contendo vacuolizações nos monocitos) e o ratio núcleocitossomal (N:C) (moderado a alto nos linfócitos e baixo a moderado nos monocitos) (Fromont, 1993; Samour & Pendl, 2009a).

Os monocitos funcionam como mediadores entre as respostas imunitárias inata e adquirida (Samour & Pendl, 2009b). Participam activamente na fagocitose de microrganismos, restos celulares e materiais estranhos (Wernery *et al.*, 2004), em respostas inflamatórias e no processamento de antígenos (Campbell, 2004a). São responsáveis pela interacção antígeno-imunoglobulina específica, principalmente em reacções envolvendo IgM e IgY, e pela apresentação de antígenos aos linfócitos (Samour & Pendl, 2009b).

### **1.3.3. Trombócitos**

Os trombócitos maduros são células ovais, mais pequenas e mais arredondadas que os eritrócitos (Campbell, 1995). Possuem um núcleo muito denso, escuro e ovóide e uma quantidade pequena a moderada de citoplasma incolor ou de coloração acinzentada pálida (Campbell, 2004a; Clark *et al.*, 2009) (ver fotos em anexo – Anexo II). Frequentemente algumas destas células apresentam grânulos intracitoplasmáticos eosinófilos ou azurófilos e ocasionalmente podem mesmo apresentar vacúolos (Campbell, 2004a; Clark *et al.*, 2009). Isto, em conjunto com uma membrana celular irregular e ondulada é considerado um sinal de activação (Samour & Pendl, 2009a). Estas células são normalmente fáceis de identificar num esfregaço sanguíneo quando apresentam as suas características morfológicas normais. No entanto, em casos de alterações patológicas pode tornar-se difícil diferenciá-las claramente de linfócitos activados e eritrócitos imaturos (Samour & Pendl, 2009a). Os trombócitos desempenham um papel primordial na hemostase e tendem a agregar-se no esfregaço sanguíneo o que facilita a sua identificação (Campbell, 2004b; Fromont, 1993). Participam activamente na formação de trombos e cicatrização de feridas, podendo ainda ter uma função fagocitária e ajudar na remoção de material estranho do sangue devido à grande quantidade de serotonina que possuem (Campbell, 1995; Campbell, 2004a; samour & Pendl, 2009b).



#### **1.4. Influências Fisiológicas e patológicas nas características hematológicas das aves**

Para que seja possível o reconhecimento de respostas hematológicas a diferentes doenças, é necessário que o hematologista esteja ciente dos numerosos factores, artefactuais, fisiológicos e patológicos, que podem afectar os valores hematológicos analisados e as características das células hemáticas (Clark *et al.*, 2009).

Variados factores fisiológicos, relacionados com riqueza de espécies de aves existentes e com a elevada diversidade metabólica, associada ao género, idade, estado reprodutivo e estação do ano, fazem com que os resultados das provas hematológicas apresentem grandes variações intra e inter-específicas (Samour & Pendl, 2009b). Na maioria dos casos, a influência destes factores fisiológicos manifesta-se apenas em alterações nas concentrações das células hematológicas, não afectando a morfologia das mesmas. O efeito isolado de cada um destes factores pode, no entanto, ser de difícil análise já que alguns deles podem estar interligados (Clark *et al.*, 2009).

As variações fisiológicas podem então estar relacionadas com:

- a idade: vários estudos realizados em aves de rapina (Villegas *et al.*, 2002; Hernandez & Margalita, 2010) e em aves de outros grupos (Howlett, Bailey, Samour, Naldo & D'Aloia, 2002; Schmidt, Paulillo, Santin, Dittrich & Oliveira, 2007) demonstraram que os indivíduos mais jovens apresentam valores de hematocrito, concentração de eritrócitos e concentração de hemoglobina mais baixos que os indivíduos adultos da mesma espécie. Este facto pode ser justificado por um aumento da eritropoiese (Fair, Whitaker & Pearson, 2007) e por uma maior necessidade de oxigénio que as aves adultas têm para voar (Villegas *et al.*, 2002);
- o sexo: de uma forma geral parece existir uma maior concentração de eritrócitos em machos (Fromont, 1993), no entanto, alguns estudos demonstraram não existir diferenças entre sexos para os valores sanguíneos determinados em algumas espécies de aves de rapina (Phalen, Taylor, Phalen & Bennet, 1992; Limiñana *et al.*, 2009);
- a estação do ano: parece existir uma flutuação sazonal da concentração de eritrócitos, sendo que, normalmente, o Outono e o inverno estão associados a um aumento do hematocrito e do número de eritrócitos (Clark *et al.*, 2009; Fromont, 1993). Em contraste com esta situação, não foram detectadas alterações nas concentrações de qualquer população de leucócitos associadas com a estação do ano (Clark *et al.*, 2009);
- hora do dia: a variação dos valores hematológicos ao longo do dia foi observada em numerosas espécies de aves. Estudos realizados em Búteos de cauda vermelha (Buteo

jamaicensis) em cativeiro demonstraram que tanto o hematocrito como a concentração de eritrócitos era superior pela manhã, diminuindo ao longo do dia (Rehder, Bird, Laguë & Mackay, 1982);

- a migração: o efeito da migração de longa distância foi estudado em algumas espécies, e parece haver uma diminuição do hematocrito associada com a diminuição da quantidade de gordura sub-cutânea (Clark *et al.*, 2009);

- a localização geográfica e a população: a influência que estas variáveis podem ter sobre os valores hematológicos das aves é normalmente uma indicação geral das complexas interações de vários factores que incluem habitat, competição, nutrição, idade, sexo, estrutura social, stress e estado de saúde.

As influências patológicas podem manifestar-se como alterações nas concentrações das células sanguíneas, como alterações na morfologia destas mesmas células ou como um conjunto de ambas as alterações. Variações nas concentrações das células hemáticas são frequentemente observadas em esfregaços sanguíneos de aves selvagens alojadas em centros de recuperação e a sua existência pode estar relacionada com numerosos processos patológicos (Tab.3).

O efeito do stress sobre as características hematológicas reflecte-se principalmente sobre as concentrações dos heterófilos e linfócitos. O ratio heterófilos/linfócitos é facilmente obtido por avaliação do esfregaço sanguíneo e é considerado um excelente índice de medida para o stress. Segundo os estudos de Gross e Siegel (1983) realizados em galinhas, existe uma relação linear entre a dose de corticosteróides administrados *per os* e o logaritmo do ratio H/L. Segundo estes autores, este ratio será mesmo um melhor índice de stress, especialmente do stress crónico, que a taxa sanguínea de corticosteróides. Factores indutores de stress, incluindo privação de água ou comida, temperaturas extremas, luz constante e exposição a novas situações sociais, provocam o aumento do número de heterófilos e a diminuição do número de linfócitos (Vleck, Vertalino, Vleck & Bucher, 2000).

Tabela 3. Processos patológicos indicados pelas alterações nas concentrações das células hemáticas em aves

Concentração celular	Achados hematológicos	Significado
Policitemia	Aumento do hematocrito (>55%) e da contagem total de eritrócitos (TRBC) (Samour, 2006)	Pode ocorrer devido a um aumento absoluto da eritropoiese (Policitemia primária, Policitemia vera, Policitemia secundária a situações de hipoxia, por resposta fisiológica a altitudes elevadas ou por condições patológicas como doenças circulatórias ou respiratórias crônicas, hemocromatose (iron storage disease) e raquitismo ou por alterações relativas, como consequência da redistribuição dos componentes eritrocitários ou fluidos do sangue (desidratação ou outras etiologias). (Clark <i>et al.</i> , 2009; Samour, 2006)
Anemia	Diminuição do hematocrito (< 35%) e da contagem total de eritrócitos (Samour, 2006)	A anemia absoluta pode ser indicativa de perda de eritrócitos (Hemorrágica: trauma, coagulopatias, ecto e/ou endoparasitismo intenso) de aumento da destruição de eritrócitos (Hemolítica: hemoparasitas, algumas infecções bacterianas, anemia hemolítica auto-imune) ou de diminuição da produção de eritrócitos (Hipoproliferativa: deficiências nutricionais, infecções crônicas, doenças renais crônicas, leucose aviar, intoxicações) A anemia relativa é normalmente indicativa de sobre hidratação (Clark <i>et al.</i> , 2009; Samour, 2006)
Heterofilia	Concentração de heterófilos superior ao limite máximo de um intervalo de referência adequado.	Normalmente indicativo de inflamação; Infecções bacterianas ou fúngicas (Clark <i>et al.</i> , 2009; Howlett, 2000)
Heteropenia	Concentração de heterófilos inferior ao limite mínimo de um intervalo de referência adequado.	Indicativo de uma inflamação marcada, resultando na depleção da reserva de granulócitos da medula óssea; Pode também ocorrer em situações de granulopoiese diminuída. (Clark <i>et al.</i> , 2009)
Linfócitose	Concentração de linfócitos superior ao limite máximo de um intervalo de referência adequado.	Indicativo de estimulação imunitária: Pode indicar a existência de leucose linfóide; Uma linfócitose marcada com ou sem células imaturas indica leucemia linfóide, enquanto uma linfócitose marcada com predomínio de linfócitos pequenos e maduros, com margens irregulares, indica neoplasia linfóide. (Clark <i>et al.</i> , 2009; Campbell, 1994; Howlett, 2000)
Linfopénia	Concentração de linfócitos inferior ao limite mínimo de um intervalo de referência adequado.	Normalmente indicativo de stress. (Clark <i>et al.</i> , 2009)
Monocitose	Concentração de monocitos superior ao limite máximo de um intervalo de referência adequado.	Normalmente indicativo de inflamação; Pode estar associada a clamidiose, doenças granulomatosas bacterianas e micóticas, infecções micobacterianas e necrose tissular massiva (Clark <i>et al.</i> , 2009; Campbell, 1995).
Eosinofilia	Concentração de eosinófilos superior ao limite máximo de um intervalo de referência adequado.	Normalmente associada a parasitismo, no entanto, tem sido difícil induzir eosinofilia experimentalmente usando antígenos de parasitas (Clark <i>et al.</i> , 2009; Samour, & Pendl, 2009b).

Como referido anteriormente, as influências fisiológicas raramente se manifestam como alterações morfológicas das células hematológicas e, como tal, a presença de atípia morfológica é uma forte evidência de resposta a um processo de doença (Clark *et al.*, 2009). Por serem numerosas as possíveis alterações morfológicas encontradas, serão descritas apenas as consideradas mais relevantes para o seguimento deste trabalho.

Nos eritrócitos, as alterações morfológicas mais frequentemente descritas são a policromasia (número elevado de eritrócitos policromáticos), a poiquilocitose (número elevado de eritrócitos com formas anormais) e a anisocitose (aumento da variabilidade do tamanho dos eritrócitos). Na maioria dos casos todas estas alterações inespecíficas estão associadas a um aumento de eritropoiese, relacionado com um processo de anemia

regenerativa (Fromont, 1993). Podem ainda ser observadas outras alterações morfológicas a nível dos eritrócitos, nomeadamente a existência de corpos de inclusão no seu interior:

- Corpos de Heinz: estruturas azuis pálidas ou violeta, de tamanho e forma irregular, associadas à membrana celular. Representam hemoglobina desnaturada e são indicativos de lesão oxidativa (Clark *et al.*, 2009; Fromont, 1993; Pendl, 2006).
- Corpos de Howell Jolly: estruturas únicas, esféricas e excêntricas, contendo ADN e resultantes de uma divisão nuclear anormal (Fromont, 1993; Pendl, 2006).
- Pontuações basofílicas: pequenos grânulos irregularmente distribuídos pelo citoplasma, normalmente causados pela presença de agregados ribossomais residuais. Nas aves, o seu significado é sempre patológico, estando associados a deficiências em ferro ou hemoglobina e intoxicação por chumbo (Clark *et al.*, 2009; Fromont, 1993; Pendl, 2006).

Os heterófilos podem exibir alterações tóxicas representadas por basofilia citoplasmática, vacuolização, degeneração nuclear, granulação anormal e desgranulação (Campbell, 1995). A expressão “granulação tóxica” aplicada aos heterófilos é enganadora, já que sugere o desenvolvimento de grânulos tóxicos pela presença de toxinas (Samour & Pendl, 2009a). Na realidade, qualquer granulação tóxica não é mais que um acumular anormal de grânulos imaturos e áreas citoplasmáticas basofílicas, representando um desvio à esquerda. Os heterófilos imaturos raramente estão presentes na circulação periférica de uma ave mas, quando isto acontece, reflecte uma enorme demanda periférica de heterófilos e uma depleção do pool de armazenamento de heterófilos maduros nos tecidos periféricos (Campbell, 1994). O grau de toxicidade dos heterófilos é avaliado segundo uma escala que varia desde +1 a +4 (Campbell, 1994; Campbell, 1995; Fromont, 1993; Samour & Pendl, 2009a) (ver fotos em anexo – Anexo II):

- +1: ligeira basofilia citoplasmática;
- +2: citoplasma mais basofílico e desgranulação parcial;
- +3: basofilia citoplasmática marcada, desgranulação moderada e vacuolização do citoplasma;
- +4: citoplasma profundamente basofílico, desgranulação moderada a marcada (mostrando frequentemente grânulos grandes formados por fusão), vacuolização citoplasmática e cariorréxis e cariólise.

Ocasionalmente, os linfócitos podem exibir grânulos azurófilos ou corpos magenta no seu citoplasma e projecções citoplasmáticas, também conhecidas por pseudópodes, ambos sinais de activação linfocitária (Campbell, 20054a; Clark *et al.*, 2009; Samour & Pendl, 2009a). Frequentemente, encontramos também células plasmáticas que são grandes linfócitos B, com núcleo em posição excêntrica, citoplasma abundante e profundamente basofílico e um aparelho de Golgi proeminente (Campbell, 2004; Fromont, 1993) (ver fotos em anexo – Anexo II).

## 1.5. Hemoparasitas

Os hemoparasitas foram descritos pela primeira vez em 1885 por Danilewsky, um professor da Universidade de Cracóvia, que examinou o sangue de aves pertencentes às famílias Accipitridae, Laniidae e Corvidae (Bennet, Peirce & Ashford, 1993; Krone, Priemer, Streich, Sömmmer, Langgemach & Lessow, 2001; Valkiūnas, 2005). Desde essa data foram encontrados hemosporídeos em cerca de 68% das espécies de aves examinadas (Loye & Zuk, 1991; Krone *et al.*, 2001). Os hemosporídeos (classe Sporozoa: Ordem Haemosporida) são um grupo peculiar e filogeneticamente destacado de hemoparasitas heteroxenos, que parasitam anfíbios, répteis, aves e mamíferos e que usam dípteros sugadores de sangue como vectores (Valkiūnas, 2005). Têm uma distribuição cosmopolita (Krone *et al.*, 2001; Martinsen, Blumberg, Eisen & Schall, 2008) e são um dos grupos de protozoários mais bem estudados e conhecidos, devido ao facto de incluírem o agente da malária, uma das doenças mais comuns em humanos em países de clima tropical (Valkiūnas, 2005).

O hemoparasitismo das aves é tipicamente causado por 3 géneros de parasitas do filo Apicomplexa: *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* e *Plasmodium* (Donovan, Schrenzel, Tucker, Pessier, Stalis, 2008). Alguns autores agrupam estes três géneros numa única família, a Plasmodiidae (Martinsen *et al.*, 2008), enquanto Valkiūnas (2005) separa o género *Leucocytozoon* numa família própria, a Leucocytozoidae. Para além destes 3 géneros existem outros descritos em aves, mais raros e menos estudados, entre os quais: *Trypanosoma*, *Hepatozoon*, *Babesia* e *Atoxoplasma* (Fromont, 1993).

Apesar dos parasitas pertencentes aos três géneros de hemosporídeos apresentarem ciclos de vida semelhantes, diferenças existentes nos tecidos infectados do hospedeiro vertebrado e na intensidade dos estágios sanguíneos, podem originar diferentes níveis de virulência (Donovan *et al.*, 2008). No entanto, de uma forma geral, a infecção por hemoparasitas em aves, atravessa fases clínicas semelhantes:

- 1) Fase pré-patente: o parasita desenvolve-se nos tecidos e não pode ser encontrado na circulação sanguínea;
- 2) Fase Aguda: caracterizada pelo aparecimento do parasita no sangue e por um forte aumento da parasitémia;
- 3) Fase de Crise: quando a parasitémia e o stress fisiológico atingem o seu pico;
- 4) Fase Latente ou Crónica: quando a parasitémia diminui rapidamente sob o impacto da resposta imunitária e o hospedeiro demonstra poucos ou nenhuns sinais de infecção. (Loye & Zuk, 1991).

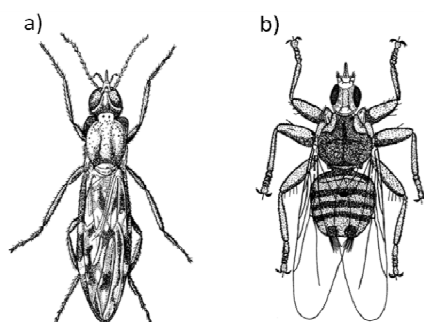
Uma vez infectada, uma ave pode manter o parasita por muitos anos ou mesmo para toda a vida, funcionando desta forma, como portador são, sendo uma fonte de infecção permanente para os vectores (Valkiūnas, 2005).

### 1.5.1. Ciclo de vida e Descrição dos diferentes géneros

#### a) *Haemoproteus*

Os parasitas do género *Haemoproteus* são dos hemoparasitas mais comuns e de mais ampla distribuição em aves selvagens, no entanto, a sua potencial importância enquanto agentes de doença nestes animais continua largamente desconhecida (Atkinson, 2008; Campbell, 1995; Garvin & Greiner, 2003). A sua transmissão ocorre através de insectos sugadores de sangue, nomeadamente insectos Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) e moscas hipoboscídeas (Hippoboscidae) (Fig.1) (Greiner & Ritchie, 1994; Martinsen *et al.*, 2008; Valkiūnas, 2005). O desenvolvimento sexual do parasita ocorre nos insectos enquanto os estádios assexuais ocorrem nas aves (Campbell, 1995; Donovan *et al.*, 2008). Desta forma, as aves funcionam como hospedeiro intermediário (hospedeiro vertebrado) e os insectos como hospedeiro definitivo (Valkiūnas, 2005).

Figura 1. Vectores do género *Haemoproteus*. a) Mosquito *Culicoides nubeculosus*; b) Mosca hipoboscídea *Pseudolynchia canariensis* (= *Lynchia maura*) (Valkiūnas, 2005)



O complexo ciclo de vida de *Haemoproteus* spp. caracteriza-se pela existência de esquizogonia (isto é, merogonia) no interior de células endoteliais viscerais, normalmente ao nível dos pulmões, fígado ou baço (Fromont, 1993; Donovan, 2008), e pelo desenvolvimento de gametocitos nos eritrócitos ciculantes do hospedeiro aviar (Donovan, 2008).

Os esporozoítos injectados pelos vectores na circulação sanguínea das aves iniciam o desenvolvimento dos merontes exoeritrocitários, mais frequentemente a nível dos pulmões (Valkiūnas, 2005). Os merozoítos desenvolvem-se em megalomerontes, que penetram no

interior dos eritrócitos, dando origem aos gametócitos (ver Anexo III – Diferentes géneros de hemoparasitas observados) (Campbell, 2004a). A hemozoína, pigmento resultante da digestão da hemoglobina, produz-se nos gametócitos sob a forma de grânulos dourados-acastanhados, castanhos ou negros (Atkinson, 2008). O número, forma e posição destes grânulos nos gametócitos é uma característica importante para a determinação da espécie do parasita (Valkiūnas, 2005).

Os gametócitos com capacidade de gametogénese surgem cerca de 2 ou 3 dias depois da penetração dos merozoítos nos eritrócitos (Valkiūnas, 2005). O ciclo sexual inicia-se quando o vector se alimenta de sangue de um hospedeiro infectado, contendo os estágios sexuais do parasita, nomeadamente macrogametócitos femininos e microgametócitos masculinos (Atkinson, 2008). A gametogénese e a fertilização ocorrem no intestino dos vectores, produzindo-se um zigoto móvel, designado oocineto. Posteriormente, este migra através da camada epitelial do intestino do vector, tornando-se um oocisto esférico sob a lamina basal (Atkinson, 2008; Valkiūnas, 2005).

O desenvolvimento do parasita em ambos os vectores é similar, no entanto, o tamanho do oocisto, o número de esporozoítos produzidos e a duração da esporogonia difere entre os dois tipos de vectores (Valkiūnas, 2005). Nos Culicoides o oocisto mede aproximadamente 10 µm de diâmetro e a esporogonia dura apenas 4-6 dias, produzindo-se menos de 100 esporozoítos que surgem de um único esporoblasto. A duração da esporogonia inferior a 10 dias é uma adaptação a um ciclo gonadotrófico relativamente curto (7 a 10 dias) dos mosquitos, que resulta na chegada dos esporozoítos às glândulas salivares dos mosquitos a tempo da próxima refeição (Valkiūnas, 2005). Nas moscas hipoboscídeas, o oocisto é consideravelmente maior, podendo atingir os 40 µm de diâmetro, e a esporogonia demora cerca de 10 dias a completar-se, produzindo-se milhares de esporozoítos que emergem de múltiplos esporoblastos (Atkinson, 2008). Este tipo de desenvolvimento, não sincronizado com a refeição do vector, é uma adaptação ao modo de vida das moscas hipoboscídeas com um tempo de vida relativamente longo e que passam longos períodos sobre a ave (Valkiūnas, 2005).

Após o total desenvolvimento do oocisto, este sofre ruptura e liberta os esporozoítos produzidos no hemocélio dos vectores. Estes invadem as suas glândulas salivares, sendo inoculados na ave durante a refeição de sangue seguinte.

O parasitismo por *Haemoproteus* é diagnosticado pela presença de gametócitos intraeritrocitários pigmentados e pela ausência de esquizontes na circulação sanguínea (Campbell, 1995; Clark *et al.*, 2009; Fromont, 1993; Peirce, 2000). A diferenciação entre macro e microgametócitos nos esfregaços sanguíneos é possível tendo em conta determinadas características das formas parasitárias: núcleo mais compacto, citoplasma mais denso e grânulos de pigmento distribuídos uniformemente nos macrogametócitos,

contrastando com o núcleo menos denso, citoplasma mais claro e grânulos mais agrupados ocupando uma posição polar nos microgametocitos (Campbell, 1995; Peirce, 2000). Normalmente podem distinguir-se cinco formas morfológicas de gametocitos de *Haemoproteus* no interior dos eritrócitos das aves, nomeadamente, microhalteridial, halteridial, circumnuclear, rabdossomal e discossomal (Bennet *et al.*, 1994a; Clark *et al.*, 2009; Fromont, 1993; Peirce, 2000), sendo a forma halteridial a mais comum e a que representa o maior grupo (65%) (Peirce, 2000).

Existem cerca de 135 espécies do género *Haemoproteus* (Krone *et al.*, 2008), todas elas com especificidade para cada família de hospedeiros (Bennet, Peirce & Earlé, 1994). A grande maioria destas espécies tem sido descrita com base na morfologia dos estádios sanguíneos, os gametocitos. Outros estádios do seu ciclo de vida são descritos apenas para um pequeno número de espécies e não pode ser utilizada de forma corrente para a identificação das diferentes espécies (Valkiūnas, 2005). Das espécies de *Haemoproteus* existentes, 6 foram descritas em aves pertencentes à ordem Falconiformes, enquanto 4 espécies foram reconhecidas em aves da ordem Strigiformes (Krone, *et al.*, 2008; Valkiūnas, 2005).

*H. elani* (sin: *H. Buteonis* = *H. figueiredoi* = *H. circus*) parasita a família *Accipitridae* (Fromont, 1993). Os gametocitos têm um tamanho moderado e são bastante polimórficos: uns apresentam forma em halter enquanto outros apresentam formas quase circumnucleares. O citoplasma tem um aspecto granular por conter pequenos vacúolos e em média, 15 grânulos pigmentares regularmente repartidos pelo citoplasma (Peirce, Bennet & Bishop, 1990). *H. nisi* foi descrito mais recentemente nos *Accipitriformes* e em particular no Gavião (*Accipiter nisus*) (Fromont, 1993). Caracteriza-se pela presença de grânulos de volutina<sup>1</sup> (ou grânulos metacromáticos) e pela sua forma geralmente em halter, com bordos irregulares, contendo em média 17 grânulos pigmentares (Peirce, *et al.*, 1990).

Ainda na família *Accipitridae*, *H. janovyi* é um parasita dos abutres africanos. *H. saviannae* e *H. asturisdussumieri* são classificadas como espécies *incertae sedis* e *H. accipiter* é considerada *nomen nudum* (Fromont, 1993).

Na família *Falconidae* destacam-se *H. tinnunculi* (sin: *H. cerchneisi*), com forma de halter e uma média de 23 grânulos pigmentares e *H. brachiatus*, descrito no Peneireiro Comum (*Falco tinnunculus*) e em tudo semelhante ao *H. nisi*. No entanto, *Haemoproteus brachiatus* ocorre em aves pertencentes à família *Falconidae* enquanto *H. nisi* ocorre em membros da família *Accipitridae*.

---

<sup>1</sup> são complexos intracitoplasmáticos de armazenamento de polifosfato inorgânico encontrados em algumas bactérias e protozoários



Com base na demonstrada especificidade do gênero para cada família de hospedeiros, *H. branchiatus* é considerada uma espécie separada, sendo que apenas estudos experimentais de transmissão cruzada poderão confirmar a sua validade (Peirce, *et al.*, 1990). A espécie *H. erythropi*, também descrita em falconiformes é considerada *nomen nudum*.

*H. syrnii* (sin: *H. aegyptius* = *H. glaucidii partim* = *H. multiparasitans* = *H. celli partim*) é provavelmente a espécie mais comum na família *Strigidae*. Tem um tamanho mediano, forma de halter e extremidades frequentemente redondas. Possui entre 15 a 20 granulos pigmentares e grânulos de volutina localizados em posição polar (Fromont, 1993). A espécie *H. noctuae* (sin: *H. bramae* = *H. nebraskensis* = *H. glaucidii partim* = *H. celli partim*) também descrita nos strigiformes tem forma circumnuclear e contém em média 13 grânulos pigmentares. *H. tytoni* é a única espécie de *Haemoproteus* da família Tytonidae na Europa. De grandes dimensões, provoca uma hipertrofia da célula hospedeira e possui cerca de 20-21 grânulos pigmentares (Fromont, 1993).

#### b) *Leucocytozoon*

Os parasitas do gênero *Leucocytozoon* ocorrem numa grande variedade de espécies de aves selvagens (Campbell, 1995), incluindo várias espécies de aves de rapina (Forrester & Greiner, 2008).

De uma forma geral são transmitidos por muscídeos simuliídeos sugadores de sangue (Diptera: Simuliidae) (Ashford, Wyllie & Newton, 1990; Campbell, 1995; Forrester & Greiner, 2008; Greiner & Ritchie, 1994, Sehgal, Hull, Anderson, Valkiūnas, Markovets, Kawamura, & Tell, 2006; Valkiūnas, 2005), no entanto, umas das espécies (*Leucocytozoon caulleryi*) usa insectos mordedores (família Ceratopogonidae) como vectores (Valkiūnas, 2005).

As espécies do gênero *Leucocytozoon* têm um ciclo de vida semelhante às do gênero *Haemoproteus*. Neste caso, a merogonia exoeritrocitária ocorre nas células parenquimatosas do fígado (hepatócitos), macrófagos e noutros tipos de células reticuloendoteliais, incluindo células endoteliais dos capilares sanguíneos. Os gametocitos e todos os outros estádios de desenvolvimento não apresentam grânulos de pigmento refractário, encontrados nos gametocitos de *Haemoproteus* e *Plasmodium* (Campbell, 1995; Peirce, 2000). Os gametocitos desenvolvem-se em eritroblastos, eritrócitos e leucócitos mononucleares e a merogonia não ocorre nas células sanguíneas (Valkiūnas, 2005).

Existem dois tipos morfológicos de gametocitos – os redondos, com origem na primeira geração de merontes hepáticos e os fusiformes, formados a partir da segunda geração de megalomerontes (ver Anexo III – Diferentes géneros de hemoparasitas observados) (Atkinson, 2008; Peirce, 2000; Valkiūnas, 2005). Estes megalomerontes contêm centenas de

milhares de merozoítos uninucleares que são libertados e penetram nos linfócitos e outros leucócitos dando origem aos gametocitos (Atkinson, 2008). As células infectadas tornam-se fusiformes, com um núcleo marcadamente deformado e em posição periférica (Valkiūnas, 2005). Os gametocitos fêmeas ou macrogametocitos são caracterizados pela sua coloração azul escura, núcleo condensado e citoplasma vacuolizado enquanto os microgametocitos ou gametocitos machos se caracterizam pela sua coloração azul pálida e núcleo rosa pálido difuso (Campbell, 1995). Tal como no ciclo de vida do género *Haemoproteus*, uma vez ingeridos pelos vectores, os gametocitos passam por um processo de reprodução sexuada e formam um zigoto que posteriormente se torna um oocineto. Este oocineto penetra o intestino do vector, sofre um processo de esporogonia e produz esporozoítos que migram para as glândulas salivares do insecto vector, podendo então ser injectados numa outra ave, quando o vector se alimentar novamente (Atkinson, 2008; Valkiūnas, 2005).

Existem cerca de 60 espécies do género *Leucocytozoon* (Bennet *et al.*, 1994a) todas elas específicas para um determinado hospedeiro, pelo menos a nível de família (Peirce, 2000). Na ordem Falconiformes apenas a espécie *Leucocytozoon toddi* (sin: *L. mathisi* = *L. circaeti* = *L. laverani* = *L. franchini* = *L. martyi* = *L. audieri* = *L. bacelari*) é considerada válida com base na sua morfologia (Fromont, 1993; Sehgal *et al.*, 2006; Valkiūnas, 2005). Esta espécie é essencialmente observada em jovens Gaviões (*Accipiter nisus*) no ninho (Ashford, *et al.*, 1990; Ashford, Green, Holmes & Lucas, 1991; Fromont, 1993): a forma redonda caracteriza-se pelo seu tamanho mediano, forma redonda a ovóide e núcleo elíptico, sendo os microgametocitos idênticos aos macrogametocitos; a forma alongada é oval a elíptica, tem núcleo pequeno, prolongamentos citoplasmáticos com forma variada e microgametocitos ligeiramente menores que os macrogametocitos (Fromont, 1993). Apesar dos Falconiformes serem um dos objectos de investigação favoritos dos parasitologistas, o ciclo de vida desta espécie de hemoparasita não foi ainda investigado (Valkiūnas, 2005).

*L. ziemanni* (sin: *L. danilewskyi* = *L. lutzi* = *L. ziemanni* var *bubonis* = *L. ziemanni* var *nebraskensis*) é a única espécie de *Leucocytozoon* descrita em aves da ordem Strigiforme. A forma redonda, normalmente observada nestes animais, tem um tamanho relativamente pequeno, forma redonda a oval e núcleo com um cariossoma marcado (Fromont, 1993).

### c) *Plasmodium*

Os parasitas do género *Plasmodium*, causadores da malária aviar, são encontrados nas principais regiões zoogeográficas do mundo (com excepção da Antárctida) (Atkinson, 2008; Campbell, 1995) e são importantes agentes patogénicos em aves deslocadas dos seus habitats, particularmente em parques zoológicos (Fromont, 1993). A sua transmissão ocorre através de mosquitos culicídeos (Diptera: Culicidae), maioritariamente pertencentes aos

gêneros *Culex*, *Aedes* e *Culiseta*. Mosquitos do gênero *Anopheles* são também vectores de algumas espécies. Apenas as fêmeas destes dípteros se alimentam de sangue, pelo que apenas elas participam na dispersão da infecção (Valkiūnas, 2005).

As espécies do gênero *Plasmodium* que infectam as aves, partilham características morfológicas e de desenvolvimento com os parasitas hemosporídeos dos gêneros *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*, no entanto, distinguem-se de ambos pela presença de reprodução assexuada (merogonia) nos eritrócitos circulantes (Atkinson, 2008; Peirce, 2000; Valkiūnas, 2005). O esquema geral do seu ciclo de vida está representado na Fig.2.

De uma forma geral, o desenvolvimento do parasita nas aves pode ser dividido em merogonia exoeritrocitária, merogonia eritrocitária e formação de gametocitos. Por sua vez, a merogonia exoeritrocitária é arbitrariamente dividida em primária (pré-eritrocítica) e secundária (pos-eritrocítica) (Fromont, 1993; Valkiūnas, 2005).

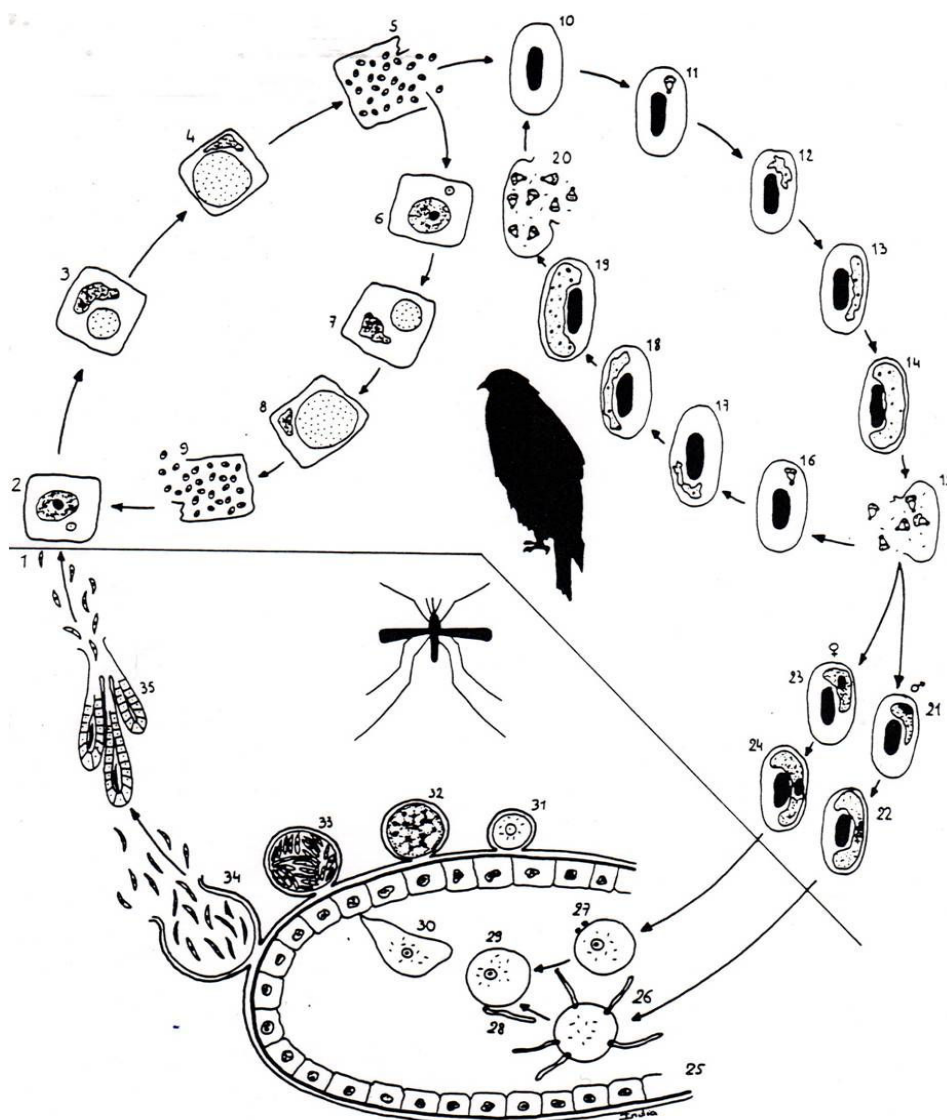
Os esporozoítos inoculados pelo vector na ave dão origem à primeira geração de merontes exoeritrocitários primários que se desenvolvem principalmente nas células reticulares de vários órgãos e tecidos incluindo a pele (Valkiūnas, 2005). Os merozoítos de primeira geração são frequentemente encontrados no baço e nesta fase não podem ainda infectar as células sanguíneas.

O tempo decorrido desde a inoculação dos esporozoítos até à maturação da primeira geração de merozoítos é chamado de período pré-patente e normalmente não excede as 120 horas, no caso do *Plasmodium relictum* (Valkiūnas, 2005).

Os merontes exoeritrocitários secundários desenvolvem-se nos macrófagos de vários órgãos: fígado e baço principalmente, mas também nos capilares sanguíneos cerebrais (*P.relictum*, *P. circumflexum*, *P. fallax*, *P. lophurae*), pulmões (*P. circumflexum*, *P. fallax*, *P. vaughani*, *P. elongatum*), medula óssea (*P. circumflexum*, *P. vaughani*, *P. elongatum*), coração (*P. circumflexum*, *P.fallax*) e rins (*P. fallax*, *P. vaughani*) e produzem merozoítos capazes de infectar as células sanguíneas (Fromont, 1993; Valkiūnas, 2005).

Os parasitas, que penetram em eritrócitos jovens e/ou eritrócitos maduros, tornam-se redondos e originam aos trofozoítos. Os trofozoítos jovens possuem um vacúolo grande e um núcleo excêntrico, dando-lhes um aspecto característico de anel, no entanto esta forma não ocorre em todas as espécies de *Plasmodium*, podendo os trofozoítos apresentar formas muito variadas. A quantidade de citoplasma e o tamanho do núcleo aumentam com o crescimento do parasita e mais tarde, aparecem os grânulos pigmentares de hemozoína. A partir do momento da primeira divisão nuclear, o parasita desenvolve-se para um estágio designado meronte eritrocitário (ver Anexo III – Diferentes gêneros de hemoparasitas observados). Como resultado da divisão múltipla assexuada, formam-se merozoítos uninucleares no interior destes merontes.

Figura 2. Diagrama representativo do ciclo de vida de *Plasmodium sp.* em aves de rapina (Fromont, 1993)



**1-9) Merogonia exoeritrocitária:** 1) Merozoítos das glândulas salivares do mosquito entram nas células hepáticas; 2-4) Desenvolvimento dos merontes exoeritrocitários primários; 5) Meronte maduro liberta merozoítos; 6-9) Merogonia exoeritrocitária secundária. **10-20) Merogonia eritrocitária:** 10) Eritocito do sangue circulante; 11-14) Maturação do meronte eritrocitário; 15) Meronte eritrocitário maduro origina merozoítos eritrocitários e gametocitos; 16-20) Repetição da merogonia eritrocitária. **21-29) Gametogonia:** 21-22) Desenvolvimento do gametocito macho em microgametocito no sangue circulante; 23-24) Desenvolvimento do gametocito fêmea em macrogametocito; 25) Parede gástrica do mosquito; 26) Extraflagelação do microgametocito origina microgâmetas no estômago do mosquito; 27) Macrogâmetas; 28) Microgâmetas livres dirigem-se ao macrogâmetas; 29) Zigoto formado pela união dos dois gâmetas. **30-35) Merogonia:** 30) Oocineto formado pelo alongamento do zigoto e penetração na parede gástrica; 31) Oocisto formado pelo oocineto depois de atravessar a parede gástrica e sua localização sobre a membrana elástica na superfície externa do estômago; 32-33) Desenvolvimento do oocisto e formação dos esporozoítos; 34) Ruptura do oocisto maduro com dispersão dos esporozoítos para as glândulas salivares do mosquito; 35) Glândulas salivares do mosquito contendo esporozoítos maduros.

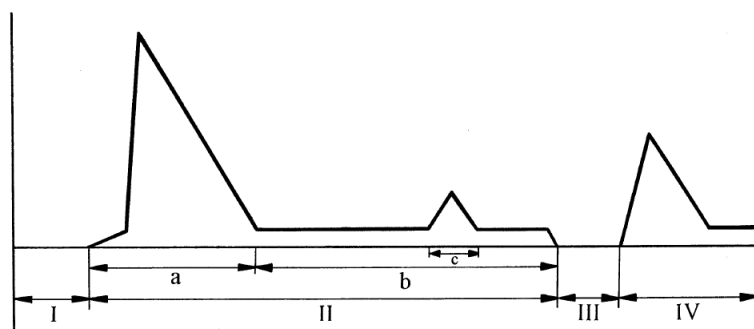
Os merontes eritrocitários contêm grânulos dourados, castanhos ou negros, que frequentemente se agrupam nos merontes maduros. Este pigmento é o resíduo que se forma do processo de digestão da hemoglobina, que no caso dos géneros *Plasmodium* e *Haemoproteus* é uma digestão incompleta. No caso do *Leucocytozoon*, o metabolismo da hemoglobina é completo e como tal não se observam estes grânulos (Atkinson, 2008; Fromont, 1993; Valkiūnas 2005).

Parte dos merozoítos formados nos merontes eritrocitários induz os ciclos seguintes de merogonia eritrocitária e origina os gametocitos, enquanto a outra parte penetra nas células endoteliais dos capilares de diversos órgãos incluindo o cérebro, iniciando a merogonia exoeritrocitária secundária. (Peirce, 2000). A maturação da primeira geração de merontes exoeritrocitários secundários, normalmente coincide com o período de grande aumento da parasitémia. Estes merontes, juntamente com os merontes eritrocitários produzem merozoítos, mantendo a parasitémia durante os estádios crónicos de infecção (Valkiūnas, 2005). Os ciclos de merogonia intraeritrocitária continuam indefinidamente a não ser que o sistema imunitário do hospedeiro ou a morte intervenham (Atkison, 2008). Desta forma, existe um potencial de persistência da infecção com recaídas frequentes (Peirce, 2000).

Valkūnas (2005) descreve o esquema geral da dinâmica da parasitémia por *Plasmodium* em aves em 3 estádios: a) agudo ou parasitémia inicial - quando um grande número de parasitas está presente na circulação sanguínea das aves infectadas e que varia de 1 a várias semanas ou meses, dependendo da espécie e estirpe do parasita, da espécie do hospedeiro vertebrado, entre outros factores; b) crónico – quando ocorre uma diminuição da parasitémia nos indivíduos sobreviventes, que permanece por períodos de tempo significativamente variáveis e que pode mesmo durar toda a vida do hospedeiro. Durante este estágio poucos parasitas são encontrados no sangue; c) recrudescência – quando uma quebra na imunidade durante o estágio crónico conduz a um aumento de curta duração do número de parasitas existente no sangue (Fig 3).

Tal como acontece nos outros hemosporídeos, o aumento da intensidade de infecção coincide normalmente com a estação de cria quando as populações de insectos sugadores de sangue aumentam e as populações de aves sensíveis estão a crescer (Loye & Zuk, 1991; Valkiūnas, 2005). Denominado “recaída de Primavera”, o aumento do número de parasitas na circulação periférica pode ser desencadeado pela corticosterona ou por aumentos no fotoperíodo e subseqüentes alterações fisiológicas nos níveis de hormonas que regulam os ritmos circadianos, como a melatonina (Valkiūnas, Bairlein, Iezhova & Dolnik, 2004)

Figura 3. Diagrama de representação da dinâmica da parasitêmia da malária das aves  
(Valkiūnas, 2005)



I - Período pré-patente (o parasita desenvolve-se em órgãos internos); II - parasitêmia inicial; III – período latente da infecção (o parasita está ausente do sangue mas persiste nos órgãos internos); IV – parasitêmia secundária devido a uma recaída; a – c) estágio da parasitêmia: a) agudo, b) crônico, c) recrudescência. A abcissa representa o calendário e a ordenada é relativa à intensidade da parasitêmia.

Os gametócitos de todas as espécies de *Plasmodium* aviar permanecem na circulação sanguínea sem continuar o seu desenvolvimento até que sejam ingeridos pelos insectos vectores (Atkinson, 2008). Vários minutos depois dos vectores se alimentarem numa ave infectada, os gametócitos maduros existentes no seu intestino tornam-se arredondados e escapam-se dos eritrócitos (Valkiūnas, 2005). Tem lugar a formação dos gâmetas, a fertilização e o desenvolvimento do oocineto móvel. Este processo acontece de acordo com o mesmo esquema para todos os hemosporídeos (*Haemoproteus*, *Leucocytozoon* e *Plasmodium*).

A taxa de esporogonia depende de diversos factores, entre os quais um dos mais importantes é a temperatura. A duração do ciclo num determinado vector a uma dada temperatura é uma característica específica utilizada para o diagnóstico de várias espécies, como por exemplo, *P. relictum* cujas temperaturas óptimas de desenvolvimento estão próximas dos 25°C. Em contraste, no hospedeiro vertebrado, a duração do ciclo é constante e pouco influenciável (Fromont, 1993).

Existem cerca de 34 espécies de *Plasmodium* que podem infectar as aves (Peirce, 2000), 5 das quais descritas em Falconiformes e outras 5 em Strigiformes (Krone *et al.*, 2008). Estas espécies podem ser divididas em 5 subgéneros diferentes, baseados na morfologia dos gametócitos e merontes e na preferência por eritrócitos maduros ou imaturos: *Haemamoeba*, *Giovannolaia*, *Novyella*, *Bennettinia* e *Huffia* (Atkinson, 2008; Peirce, 2000). *P. relictum* (sin: *P. praecox*) (subgénero *Haemamoeba*) é a espécie mais frequente em aves de vida livre, tendo sido descrita em mais de 360 hospedeiros de 70 famílias (Peirce, 2000). É a espécie com mais ampla distribuição geográfica e uma das mais patogénicas,

apresentando como principal característica o facto de que os merontes e os gametocitos deslocam o núcleo da sua posição central (Fromont, 1993; Valkiūnas, 2005). Na espécie *P. subpraecox* (subgénero *Haemamoeba*) as formas sanguíneas são idênticas às de *P. relictum*, como tal, o seu diagnóstico é feito com base na duração da merogonia no vector. Aparece com mais frequência nos Strigiformes mas continua a ser muito pouco conhecida (Fromont, 1993).

*P. fallax* (subgénero *Huffia*), também descrita nos Strigiformes, apresenta formas sanguíneas (merontes e gametocitos) alongadas que ocupam uma posição lateral ao núcleo dos eritrócitos infectados. Não provocam a deslocação do mesmo e nunca o envolvem completamente (Clark *et al.*, 2009; Valkiūnas, 2005).

A espécie *P. circumflexum* (subgénero *Huffia*) é bastante comum em aves das ordens Falconiformes e Strigiformes, mas ocorre principalmente em aves da ordem Passeriformes, onde foi descrita em mais de 100 espécies (Valkiūnas, 2005). O seu nome reflecte a forma circumnuclear das formas sanguíneas, que envolvem totalmente ou quase totalmente o núcleo (Fromont, 1993; Valkiūnas, 2005).

Na espécie *P. elongatum* (subgénero *Huffia*) os estádios assexuados desenvolvem-se principalmente em eritrócitos jovens, enquanto os gametocitos se desenvolvem maioritariamente em eritrócitos maduros. Os gametocitos maduros não deslocam o núcleo dos eritrócitos infectados, ou fazem-no muito pouco e não preenchem completamente os pólos destas mesmas células (Valkiūnas, 2005). Os macrogametocitos são mais escuros que os microgametocitos e o seu núcleo é mais condensado (Fromont, 1993). Parasita aves das ordens Falconiformes e Strigiformes, mas ocorre mais frequentemente em Passeriformes (Valkiūnas, 2005).

Em estádios iniciais de infecção, apenas os trofozoítos e os merontes podem ocorrer nos eritrócitos, dificultando o diagnóstico específico (Peirce, 2000). Os merontes são estruturas ovóides que aparecem no citoplasma dos eritrócitos, tanto maduros como policromáticos, em posição polar ou lateral ao núcleo. Tipicamente, a forma da célula hospedeira não é alterada pela sua presença, mas o núcleo pode ser ligeiramente deslocado (Clark *et al.*, 2009). Por outro lado, em infecções antigas apenas os gametocitos podem estar presentes e, se estes são de espécies com formas alongadas, podem ser facilmente confundidos com gametocitos de *Haemoproteus* (Peirce, 2000).

#### d) *Trypanosoma*

Os flagelados do género *Trypanosoma* (Cinetoplastida, Trypanosomatidae) são parasitas sanguíneos com uma ampla distribuição geográfica e ampla gama de hospedeiros (Sehgal, Jones & Smith, 2001; Valkiūnas *et al.*, 2004). São transmitidos por uma grande variedade de

vectores incluindo mosquitos, simúlideos e ácaros, no entanto, os vectores mais frequentes são as moscas hipoboscídeas (Fromont, 1993; Peirce, 2000; Votýpka, Oborník, Volf, Svobodová & Lukes, 2002). Pelo menos 96 espécies de *Trypanosoma* foram descritas em aves (Peirce, 2000; Sehgal *et al.*, 2001; Votýpka *et al.*, 2002), no entanto, provavelmente não mais de 10 serão válidas (Peirce, 2000). A descrição da maioria das espécies de *Trypanosoma* foi feita com base no pressuposto que todas elas seriam específicas para a espécie do hospedeiro, porém, provas experimentais demonstraram que estes parasitas podem ser transmitidos a uma variedade de espécies de aves, tornando inválida a hipótese da especificidade restrita para a espécie de hospedeiro (Sehgal *et al.*, 2001; Votýpka *et al.*, 2002).

As diferentes fases do ciclo de vida de *Trypanosoma spp* exibem morfologia variada, sendo que o estágio mais conhecido é o de tripomastigota (ver Anexo III – Diferentes géneros de hemoparasitas observados). Regra geral, os tripomastigotas têm uma forma de "lâmina" alongada que se reduz a um flagelo posterior e um flagelo anterior. Uma membrana ondulante estende-se ao longo de grande parte da extensão do organismo, um cinetoplasto escuro e basofílico está localizado na zona anterior do organismo, e um núcleo redondo e basofílico a anfofílico localiza-se cerca da região central. A morfologia e a dimensão relativa das estruturas descritas varia com a espécie e a fase de desenvolvimento do organismo (Clark *et al.*, 2009).

*T. avium* foi descrito numa grande variedade de aves (Clark *et al.*, 2009; Fromont, 1993) e segundo alguns autores, um número de "espécies" de trypanosomas aviares são considerados parte do "complexo *T. avium*" (Clark *et al.*, 2009; Bennet *et al.*, 1994b; Votýpka *et al.*, 2002).

#### e) *Hepatozoon*

Existem cerca de 15 espécies de *Hepatozoon* (Apicomplexa: Hemogregarinidae) descritos em aves (Bennett *et al.* 1992, Peirce *et al.* 2003). O seu ciclo de vida pode ser comparado com o dos hemosporídeos, apresentando algumas particularidades: a merogonia exoeritrocitária ocorre no fígado e compreende 3 a 5 gerações. Não existe merogonia eritrocitária, pelo que depois da terceira merogonia hepática os merozoítos diferenciam-se em gametocitos, visíveis principalmente em leucócitos mononucleares. Pode ser transmitido por variados vectores, desde carraças a moscas, mosquitos e flébotomos (Fromont, 1993). As aves infectam-se por ingestão do ectoparasita; as formas de *Hepatozoon* atravessam a mucosa intestinal e atingem o fígado pela circulação portal (Fromont, 1993).

As formas parasitárias são geralmente ovóides ou alongadas. Apresentam extremidades arredondadas, um núcleo redondo e basofílico, em posição central ou excêntrica sub-



terminal e citoplasma pálido, com grânulos azurófilos ocasionais. Em algumas espécies é possível ainda distinguir uma cápsula, vista como um halo branco ao redor do parasita. Macrogametocitos e microgametocitos não podem ser distinguidos morfológicamente e por vezes pode haver deslocação do núcleo da célula hospedeira (Clark *et al.*, 2009).

#### f) *Babesia*

Os hemoparasitas do género *Babesia* (Apicomplexa: Piroplasmorida) têm uma ampla distribuição tanto em animais domésticos como selvagens. Uma vez na circulação sanguínea, estes piroplasmas invadem os eritrócitos, onde os trofozoítos se multiplicam por divisão binária, formando pares ou por merogonia, formando tetradas (Samour & Peirce, 1996; Peirce, 2000). Nenhum dos vectores das espécies de *Babesia* parasitas de aves é conhecido, no entanto, assume-se que a transmissão é feita por carraças (Fromont, 1993; Muñoz, Molina e Ferrer, 1999) da família Ixodidae. No entanto, um argasídeo do género *Ornithodoros* tem sido sugerido como possível vector de *B. shortti* em falcões (Peirce, 2000). Normalmente, as espécies de *Babesia* apresentam-se como pequenos parasitas intra-eritrocitários, com uma forma clássica de "anel". Possuem uma massa de cromatina escura e excêntrica e uma fina membrana limitante, que envolve o citoplasma basofílico pálido do parasita (Clark *et al.*, 2009). Outras formas podem ser encontradas, nomeadamente formas ovóides, alongadas e piriformes.

A espécie *B. shortti* foi descrita em Peneireiros vulgares (*Falco tinnunculus*) (Muñoz *et al.*, 1999) e em Falcões sacre (*Falco cherrug*) (Samour & Peirce, 1996).

#### g) *Microfilárias*

As microfilárias, estádios larvares de nemátodos sanguíneos, são parasitas grandes (em comparação com as células do hospedeiro) com aspecto de serpentina e coloração basofílica, de frequente observação em aves (Clark *et al.*, 2009; Raharimanga, Soula, Raherilalao, Goodman, Sadonès, Tall, Randrianarivelojosia, Raharimalala, Duchemin, Arieu e Robert, 2002). São veiculados por dípteros da família Ceratopogonidae (Raharimanga *et al.*, 2002) e normalmente provocam baixos graus de parasitémia nas aves, sendo que apenas alguns parasitas estão presentes no volume de sangue usado para fazer um esfregaço sanguíneo (Clark *et al.*, 2009).

### 1.5.2. Detecção de Hemoparasitas

No contexto deste trabalho, o reconhecimento de hemoparasitas baseia-se na sua identificação a partir da observação de esfregaços sanguíneos ao microscópio óptico, de longe o método mais frequentemente utilizado pelos hematologistas para uma detecção inicial das formas parasitárias. Esta detecção é baseada nas características morfológicas apresentadas por cada género e/ou espécie de parasita sanguíneo e para que seja possível uma identificação precisa, são necessárias condições de leitura adequadas (Fromont, 1993). O exame inicial do esfregaço deve ser realizado com a objectiva de menor ampliação, de modo a permitir a detecção de parasitas de maiores dimensões, como espécies de *Trypanosoma* e microfilárias. Leucócitos alterados contendo *Leucocytozoon spp.* e eritrócitos distorcidos contendo *Haemoproteus spp.* também podem ser reconhecidos durante o exame de baixa ampliação (Clark *et al.*, 2009). Após a análise inicial do sangue, deve ser feito um exame mais detalhado usando as objectivas de maior ampliação (40 ou 100x), de forma a ser possível reconhecer parasitas de menores dimensões, tais como *Plasmodium spp.* e *Babesia spp.* Estas ampliações permitem ainda o exame de detalhes da estrutura das diferentes formas parasitárias e a contagem das mesmas, para um cálculo dos níveis de parasitémia.

No entanto, a identificação de hemoparasitas a partir do esfregaço sanguíneo nem sempre é possível, mesmo realizando um bom esfregaço e um correcto exame microscópico: algumas espécies são morfológicamente idênticas (*Plasmodium relictum* e *Plasmodium subpraecox*) e os parasitas jovens são muitas vezes semelhantes (as formas jovens de *Plasmodium sp.* e *Haemoproteus sp.* são muitas vezes indistinguíveis) (Fromont, 1993).

Os métodos de biologia molecular, principalmente o PCR (*Polymerase Chain Reaction*), são cada vez mais aplicados na detecção de hemoparasitas em aves (Krone *et al.*, 2008; Sehgal *et al.* 2001, Votýpka *et al.* 2002,), principalmente em situações em que apenas pequenos volumes de sangue estão disponíveis e que poucos hemoparasitas estão presentes (Clark *et al.*, 2009). Segundo Peirce,

a crescente utilização de técnicas moleculares no estudo dos hemoprotozoários das aves pode eventualmente clarificar a situação de muitas espécies que possuem uma morfologia semelhante, mas que ocorrem em diferentes famílias ou subfamílias. No entanto, os estudos moleculares devem apenas ser considerados como uma adição útil na taxionomia; a morfologia e ciclo de vida continuarão a ser os principais atributos para a definição de uma nova espécie (Peirce, 2005, p.3631, tradução livre).

### 1.5.3. Patogenia das hemoparasitoses e o seu impacto em aves selvagens

O impacto da patogenicidade dos hemoparasitas sobre os seus hospedeiros é extremamente difícil de definir devido aos seus complexos ciclos de vida e epidemiologia complicada. Na última década, a ideia de que os hemoparasitas são relativamente inofensivos para as aves selvagens, tem sido expressa com grande insistência o que, para além de não representar a totalidade dos factos disponíveis até ao presente, pode conduzir a um atraso na investigação sobre o papel dos hemoparasitas na biocenose natural. No entanto, para Valkiūnas (2005), “nenhum grupo de hemosporídeos é neutro para os seus hospedeiros, incluindo os hospedeiros de vida livre”, sendo esta a convicção que conduziu à realização deste trabalho.

Nas aves, as alterações patológicas causadas pelas diferentes espécies de hemoparasitas são muito variadas. Assim, neste trabalho serão apenas consideradas as alterações mais gerais da patologia das hemoparasitoses e as diferenças mais relevantes no impacto que os diferentes grupos de hemoparasitas podem ter sobre os seus hospedeiros aviários.

A consequência mais imediata das hemoparasitoses é o efeito que produzem sobre as células parasitadas: estas células são destruídas, seja pelo próprio parasita, em situações de ruptura dos merontes (quando existe merogonia intraeritrocitária, como no caso do *Plasmodium*), seja pela reacção imunitária do hospedeiro. (Fromont, 1993). Esta destruição pode ocorrer a três níveis, nomeadamente a nível dos 1) eritrócitos, 2) células parenquimatosas e epiteliais e 3) células musculo-esqueléticas.

- 1) Os eritrócitos parasitados são destruídos dando origem a uma anemia por vezes importante. Uma das principais causas de anemia nas infecções por hemosporídeos é a remoção activa de eritrócitos infectados da circulação sanguínea por células do sistema fagocítico mononuclear do baço, fígado, medula óssea e outros órgãos (Loye & Zuk, 1991; Valkiūnas, 2005). O número de células parasitadas tem influência sobre o grau de destruição dos eritrócitos, mas na realidade os parasitas mais numerosos normalmente não são os mais patogénicos; o factor preponderante é a capacidade do parasita induzir uma resposta imunitária (Fromont, 1993).
- 2) Os hepatócitos e as células epiteliais, onde se desenrolam os fenómenos de merogonia, conhecem os mesmos fenómenos de destruição ou o aparecimento de focos de necrose, mais ou menos importantes dependendo do parasita envolvido (Fromont, 1993).

- 3) Os miofibroblastos dos músculos esqueléticos podem ser afectados pela formação de megalomerontes de várias espécies de *Haemoproteus* (Valkiūnas, 2005). Estudos realizados por Atkinson e Forrester (1987) demonstraram que o desenvolvimento de megalomerontes provoca uma miosite hemorrágica aguda: os megalomerontes são rodeados por uma infiltração inflamatória hemorrágica, envolvendo macrófagos, heterófilos, células gigantes e eritrócitos. As fibras musculares envolvendo a maior parte dos megalomerontes evidenciam sinais iniciais de calcificação distrófica, a ruptura dos megalomerontes conduz à formação de grandes focos necróticos e desenvolve-se a miopatia (Atkinson, 2008; Atkinson & Forrester, 1987; Fromont, 1993; Valkiūnas, 2005).

As células não parasitadas também são afectadas pela presença destes parasitas sanguíneos. Na infecção por *Leucocytozoon*, a anemia intensifica-se pela destruição de eritrócitos não infectados, devido ao aparecimento do designado “factor anti-eritrocitário” no plasma sanguíneo (Fromont, 1993; Valkiūnas, 2005), cuja natureza não foi ainda totalmente compreendida. O aumento da fragilidade osmótica e hemólise dos eritrócitos também ocorrem em infecções por *Plasmodium spp.*, no entanto estes processos são significativamente menos pronunciados na malária aviar do que na leucocitozoonose (valkiūnas, 2005).

Os efeitos sobre os capilares sanguíneos são também muito importantes na patogenia destas infecções. Os merontes das células endoteliais, os grandes gametocitos (*Leucocytozoon*) e os grandes parasitas extracelulares (microfilárias) podem originar oclusão dos capilares sanguíneos, juntamente com um afluxo de células inflamatórias, o que provoca a formação de focos de necrose (Fromont, 1993). A lesão mais grave, provocada pelas espécies de *Plasmodium* está associada com o bloqueio dos capilares sanguíneos do cérebro e de outros órgãos vitais. Como resultado desta situação, o aporte sanguíneo ao órgão afectado é alterado, os tecidos que envolvem os merontes sofrem anoxia e as células acabam por morrer. A necrose dos tecidos adjacentes aos merontes é normalmente significativa e por vezes, as aves acabam por perecer com sintomas de paralisia cerebral (Valkiūnas, 2005). Nas infecções por *Leucocytozoon*, os gametocitos existentes no sangue formam grandes complexos parasita-hospedeiro nas células infectadas, podendo bloquear os alvéolos e os pulmões nas parasitémias severas e originar sintomatologia semelhante a uma pneumonia (Valkiūnas, 2005).

Actualmente, a informação existente sobre a patogenicidade dos hemoparasitas é quase totalmente baseada em resultados experimentais obtidos em animais domésticos, como canários, galinhas, patos, pombos e perus (Valkiūnas, 2005). A extrapolação directa destes dados para hospedeiros de vida livre é impossível. As aves selvagens e seus parasitas

passaram por um longo período de co-evolução e adaptação mútua e a interacção de vários factores (a genética e o estado imunológico, a idade, os recursos alimentares, o stress, a disponibilidade de abrigo, etc.) pode ter uma influência inesperada sobre o desenvolvimento da infecção nos animais selvagens. Em condições naturais, os animais estão envolvidos em relações competitivas complexas e extremas, que podem determinar as diferenças de status entre indivíduos, conduzindo a uma vida activa no ambiente natural ou a situações de cativeiro. Neste último caso, a protecção contra predadores e infecções está teoricamente garantida, já que os animais têm à sua disposição abundância de água, comida, etc. Desta forma, os parasitas aparentemente neutros para animais mantidos em cativeiro, podem ser responsáveis por situações de debilidade ou mesmo de doença em animais em liberdade. Alguns autores afirmam que, de uma forma geral, os hemoparasitas são mais patogénicos para seus hospedeiros de vida livre, no entanto o mecanismo de influência destas infecções sobre a fisiologia, ecologia e comportamento das aves em condições naturais não foi ainda estudado suficientemente bem (Valkiūnas, 2005; Loye & Zuk, 1991).

Os episódios epizoóticos e a mortalidade elevada atribuída a hemoparasitoses agudas, podem ocorrer quando indivíduos não imunes são trasladados para uma área endémica ou quando o parasita é introduzido numa população sem historial prévio de exposição a esse mesmo parasita. Ambos os cenários têm sérias implicações na gestão de populações ameaçadas ou em perigo de extinção, como é o caso dos pinguins em cativeiro (Loye & Zuk, 1991; Rebelo, Baptista, Afonso, Monteiro, Lapão, Sogorb, Carvalho & Mendonça, 2005).

#### **1.5.4. Resistência natural e imunidade**

A imunidade é uma forma de resistência completa a infecções, ocorrendo em indivíduos sãos e persistindo na total ausência de parasitas (Fromont, 1993). Tal como acontece noutras infecções, no combate às hemoparasitoses distinguem-se dois tipos de imunidade: inata e adquirida (Valkiūnas, 2005). A imunidade inata normalmente envolve interacções de factores fisiológicos e biológicos que influenciam a susceptibilidade do hospedeiro ao parasita. Esta forma de resistência, resultado de uma longa evolução, determina as propriedades do parasita, as quais se manifestam particularmente na sua potencial especificidade. A imunidade adquirida forma-se como resultado de uma infecção prévia do hospedeiro e pode ser mantida durante um certo período de tempo, restringindo ou prevenindo na totalidade o desenvolvimento de processos patológicos em repetidos casos de infecção (Valkiūnas, 2005). De uma forma geral, os anticorpos controlam a carga parasitária no sangue enquanto as respostas mediadas por células se dirigem

principalmente aos parasitas intracelulares (Tizard, 2009). Muito pouco se conhece sobre a imunidade adquirida nas infecções por hemoparasitas.

Praticamente nada é conhecido sobre os mecanismos imunitários em infecções por *Haemoproteus spp.*, no entanto, alguns dados experimentais indicam que aves com infecções crônicas têm uma imunidade concomitante: a infecção crônica persistente estimula a imunidade à reinfeção com parasitas homólogos da mesma espécie. (Atkinson, 2008).

Aves infectadas com espécies de *Plasmodium* aviar desenvolvem fortes reacções antigénio-anticorpo e respostas mediadas por células contra os parasitas eritrocitários, mas parecem ser incapazes de eliminar completamente a infecção. Alguns estudos indicam que estas aves permanecem infectadas em níveis crónicos durante toda a vida, apresentando um pequeno número de formas parasitárias sanguíneas por um período mais ou menos prolongado, o que estimula a imunidade à reinfeção por estirpes parasitárias homólogas (Atkinson, 2008; Valkiūnas, 2005). Desta forma, quando novamente expostas à infecção, as aves já infectadas podem apresentar apenas breves e ligeiros aumentos da parasitémia. Este fenómeno é designado premunição (Atkinson, 2008).

Em determinadas espécies de aves infectadas por *Leucocytozoon spp.*, a premunição mantém-se pela introdução de merozoítos na circulação sanguínea. A presença de merontes exoeritrocitários e gametocitos no organismo da ave infectada não previne a sua reinfeção e, pelo contrário, pode mesmo causar a sua morte (Valkiūnas, 2005).



### 2.1. Objectivos

Os principais objectivos deste trabalho, incluíram o estudo das características hematológicas e a pesquisa de hemoparasitas em aves de rapina, tentando, nos casos de detecção positiva, relacionar este facto com os resultados obtidos nas análises sanguíneas e com a condição clínica do animal.

Para tal, procurou-se identificar os géneros de hemoparasitas e as associações parasita-hospedeiro existentes na população estudada, determinar a sua prevalência e avaliar a relação existente entre a presença de hemoprotozoários e determinados parâmetros considerados relevantes para este estudo, tanto clínicos (idade, sexo, status, condição corporal) como hematológicos (hematocrito, contagem total de eritrócitos e contagem total de leucócitos)

### 2.2. Material e Métodos

Entre os meses de Outubro de 2009 e Março de 2010, foram colhidas amostras sanguíneas de 191 aves de rapina que deram entrada no hospital de fauna selvagem do *Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su habitat* (GREFA), Madrid, Espanha (40° 28'06.37 N, 3° 50'25.87 O). Este estudo envolveu aves em recuperação, aves irrecuperáveis e aves incluídas em projectos de cria em cativeiro, provenientes de toda a Comunidade de Madrid e pertencentes a 9 espécies de rapinas diurnas e a 5 espécies de rapinas nocturnas.

As amostras de sangue inteiro foram reservadas em tubos de colecta de 0.5 a 1 ml disponíveis comercialmente, contendo o agente anticoagulante EDTA (Ethylene Diamine Tetra acetic Acid), e mantidas em refrigeração a 4°C, pelo período máximo de 48h.

Os resultados obtidos no presente estudo, fazem parte de um trabalho sobre hematologia destas mesmas espécies a ser realizado no GREFA.

#### 2.2.1. Colheita das amostras de sangue

As aves foram capturadas das suas instalações ou caixas de transporte e posteriormente colocadas sobre a mesa de exploração em decúbito dorsal, sendo manipuladas sob contenção física e visão obstruída por um pano ou um caparão. Dependendo do tamanho da ave, das particularidades anatómicas de cada espécie e da condição física do paciente, as



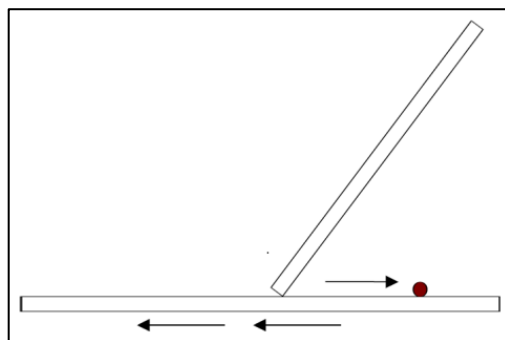
amostras sanguíneas foram colhidas a partir de diferentes veias, nomeadamente da veia jugular direita, veia ulnar superficial ou veia metatarsal medial. Em cada ave foi colhida uma pequena quantidade de sangue (até 1,5 ml dependendo da espécie), com seringas de 1 ou 2,5 ml (PIC indolor<sup>®</sup>, Artsana) e agulhas hipodérmicas de 25 (0.50x16 mm) ou 23 gauge (0.60x25 mm) (Pic indolor<sup>®</sup>, Artsana). O sangue colhido foi utilizado para realizar um esfregaço sanguíneo por escorregamento e para preencher um tubo de microhematócrito (aproximadamente 70 µl). A restante amostra foi transferida directamente para um tubo de colecta de 0.5 ou 1 ml contendo EDTA (Valv stoper K3E, Aquisel<sup>®</sup>), previamente identificado com a espécie e número de historial do animal e data.

### 2.2.2. Preparação, fixação e coloração do esfregaço sanguíneo

Os esfregaços sanguíneos foram realizados a partir de uma gota de sangue inteiro, sem adição de anticoagulantes, imediatamente após a colheita de sangue. A técnica utilizada para a sua realização foi a técnica do escorregamento, também conhecida por técnica do esfregaço em cunha (*wedge smear technique*). Para a sua realização foram usadas duas lâminas de bordos biselados (76x26 mm) (Starfrost<sup>®</sup> - Microscope slides, Waldermar Knittel Glasbearbeitungs - GmbH, Braunschweig, D-38114, Germany): a lâmina usada para estender foi colocada num ângulo de aproximadamente 45°, movida ligeiramente para trás até tocar na gota de sangue, permitindo que esta se espalhasse no bordo da lâmina, e de seguida movida para a frente, num movimento contínuo e suave (Fig.4).

Os esfregaços foram posteriormente corados usando a coloração de Wright Giemsa modificada por Jaime Samour (Samour & Pendl, 2009b) (ver Anexo IV).

Figura 4. Técnica do escorregamento ou de esfregaço em cunha (*Wedge smear technique*)

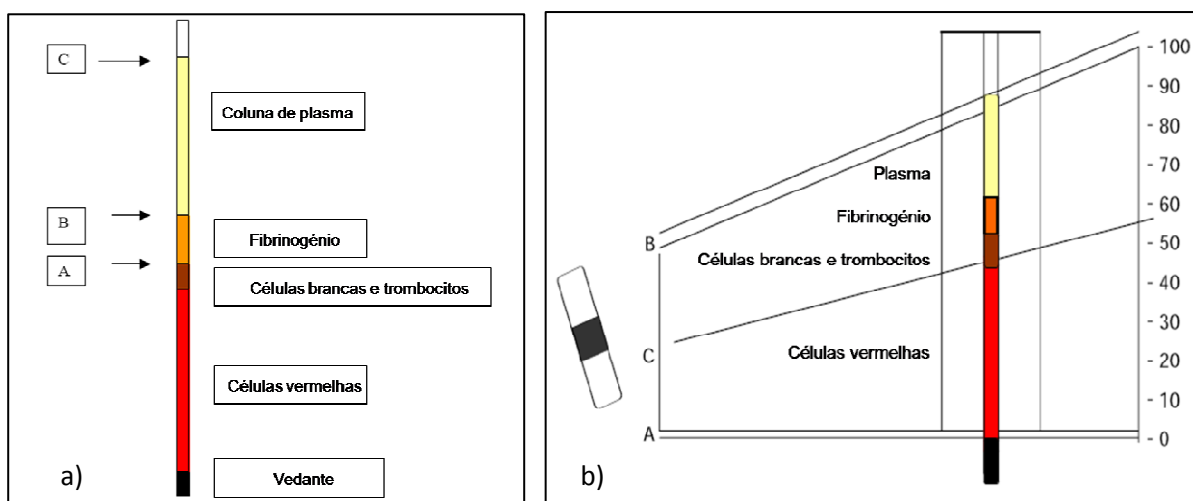


### 2.2.3. Análises hematológicas

As análises hematológicas realizadas incluíram hematócrito (Hct, %), contagem total de eritrócitos (TRBC = eritrócitos  $\times 10^6/\mu\text{l}$ ), contagem total de leucócitos (TWBC = leucócitos  $\times 10^3/\mu\text{l}$ ) e contagem diferencial de leucócitos (células/ $\mu\text{l}$ ).

O hematócrito foi determinado por centrifugação dos tubos capilares de microhematócrito numa microcentrífuga (Modelo Biocen 20, Ortoalresa®, Ajalvir, Espanha) a 12,000g por 5 minutos e posterior leitura do resultado através de uma escala. Para a leitura dos resultados fez-se coincidir a linha que demarca a separação entre o vedante e os eritrócitos com a linha A e o menisco do topo da coluna de plasma com a linha B. A linha C foi posicionada na interface entre a “buffy coat” (coluna contendo células brancas e trombócitos) e a coluna de eritrócitos e o valor de hematócrito lido na escala em percentagem, como descreve Samour (2006) (Fig.5).

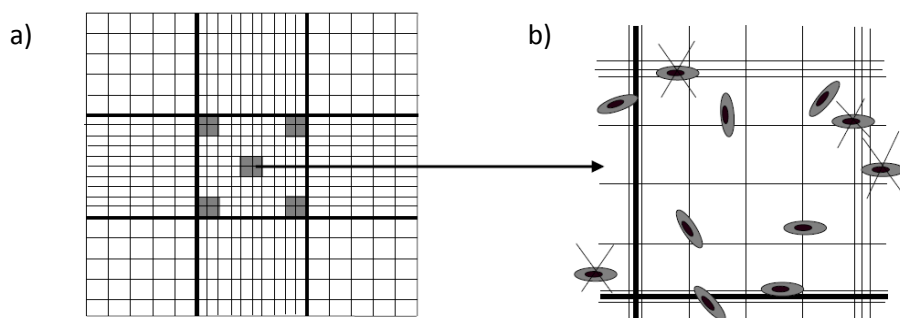
Figura 5. Determinação do hematócrito. a) Tubo de microhematócrito e b) Método de estimativa do hematócrito



A contagem total de eritrócitos (TRBC) e de leucócitos (TWBC) foi determinada num hemocitómetro, a câmara de Neubauer Improved (Blaubrand®, Brand GmbH & Co. KG, refª 717820), com a solução de Natt and Herrick's (ver Anexo V) (Samour & Pendl, 2009a). A diluição da amostra sanguínea, numa proporção de 1:200, foi realizada numa pipeta de Thoma (Blaubrand®, Brand GmbH & Co. KG), com a ajuda de um auxiliar de micropipetagem (Blaubrand®, Brand GmbH & Co. KG, Postfach 1155, D-97861 Wertheim, Cat. NO 25 800). A contagem de eritrócitos foi efectuada ao microscópio óptico binocular (BM-100B Ventix®, S/N 120624) sob uma ampliação de 400x (objectiva seca de 40x), determinando o número total de células nos quatro quadrados de canto e no quadrado do

centro da zona central da câmara de contagem (Fig.6) (Campbell, 1995). Esse valor foi então multiplicado por 10.000, para obter a contagem total de eritrócitos por microlitro de sangue (Samour & Pendl, 2009a).

Figura 6. Câmara de Neubauer Improved e Regra do L



a) Câmara de Neubauer Improved e método para contar os eritrócitos; b) Regra do L - Sistema de contagem das células: as células que tocam a linha central tripla (aqui representada como uma linha mais grossa) da esquerda e de baixo são contadas. As células que tocam a mesma linha à direita e em cima, não são contadas.

A presença de eritrócitos e trombócitos nucleados no sangue das aves opõe-se à utilização dos métodos standard de contagem de leucócitos usados para o sangue dos mamíferos. Para além do facto de todas as células existentes na circulação periférica das aves serem nucleadas (Ihedioha, 2008), também a semelhança de tamanhos entre eritrócitos e alguns leucócitos e entre trombócitos e linfócitos pequenos, torna os métodos automatizados de contagem de leucócitos utilizados nos mamíferos, ineficazes na clínica aviária (Campbell, 2004a).

O método directo para obter a TWBC é em tudo idêntico ao descrito anteriormente para TRBC, e como tal estas duas contagens foram obtidas a partir da mesma mistura com diluição de 1:200 e da mesma câmara de hemocítometro. O número total de leucócitos foi determinado por contagem de todos os leucócitos existentes nos nove quadrados grandes de um lado da câmara de contagem, aplicando a regra do L, e calculado pela aplicação da seguinte fórmula:

$$\text{TWBC (leucócitos/}\mu\text{l)} = \text{total de leucócitos nos 9 quadrados} \times 1.1 \times 200$$

As contagens diferenciais de leucócitos foram realizadas num total de 100 células brancas, em esfregaços sanguíneos corados com a coloração de Wright Giemsa modificada por Jaime Samour (2009b) (Anexo I), com a ajuda de um contador de células manual (Meteor,

model CLM-2, ca.NO 91003). As células contadas foram classificadas de acordo com as suas características morfológicas e de coloração em heterófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monocitos e, uma vez obtida a percentagem de cada grupo celular, estabeleceu-se a fórmula leucocitária em função das contagens totais de leucócitos, usando a seguinte fórmula:

$$\text{Nº de células calculado (células/}\mu\text{l)} = \frac{\% \text{ de células brancas} \times \text{TWBC}}{100}$$

#### **2.2.4. Identificação dos géneros parasitários**

A identificação dos géneros dos parasitas foi realizada por observação dos esfregaços sanguíneos ao microscópio óptico binocular (BM-100B Ventix®, S/N 120624) numa ampliação de 1000x (ocular de 10x e objectiva de imersão de 100x) e os géneros parasitários presentes, identificados de acordo com Bennet e Pierce (1988), Bishop e Bennett (1989), Peirce *et al* (1990) e Valkiūnas (2005).

#### **2.2.5. Análise estatística**

Para a análise dos dados obtidos no presente estudo foram utilizados vários métodos estatísticos do programa SPSS 17.0 para o *Windows* (SPSS, 2007).

A descrição das variáveis quantitativas estudadas, foi realizada através da estatística descritiva das amostras (procedimento DESCRIPTIVE) de forma a obter a média, desvio padrão e valores mínimo e máximo (Ferrán, 1996). No caso das variáveis qualitativas a estatística descritiva (procedimento FREQUENCIES) foi realizada para obtenção das frequências e percentagens das diferentes categorias.

Para determinar se as variáveis quantitativas analisadas apresentavam uma distribuição normal, utilizou-se o Teste de Kolmogorov-Smirnov (procedimento NPAR TESTS) (Ferrán, 1996).

A comparação de variáveis quantitativas com uma distribuição não normal foi realizada recorrendo a testes não paramétricos. O Teste de Kruskal-Wallis (procedimento NPAR TESTS), foi utilizado para a comparação das variáveis quantitativas entre mais de duas categorias de uma variável qualitativa e o teste de Mann-Whitney e Wilcoxon (procedimento NPAR TESTS) para a comparação das variáveis quantitativas entre as duas categorias de uma variável qualitativa (Ferrán, 1996). Estes testes foram aplicados às variáveis relativas às características hematológicas: Hct, TRBC, TWBC, % de heterófilos, % de eosinófilos, % de basófilos, % de linfócitos e % de monocitos. Cada uma destas variáveis foi analisada

frente à presença ou ausência de hemoparasitas de forma a verificar se a existência de qualquer alteração nos parâmetros hematológicos de cada espécie, estaria ou não relacionada com a presença de hemoparasitas de um modo estatisticamente significativo.

Para este estudo estatístico os animais foram categorizados em 4 grupos consoante as espécies a que pertenciam: águias (n=58), abutres (n=18), peneireiros (n=87) e nocturnas (n=28). Ao primeiro grupo pertenciam os indivíduos da Família *Accipitridae* das espécies Águia real (*Aquila chrysaetos*), Águia de Bonelli (*Aquila fasciata*), Águia cobreira (*Circaetus gallicus*), Águia de asa redonda (*Buteo buteo*) e Milhafre real (*Milvus milvus*); o segundo grupo incluía as duas espécies de necrófagas estudadas, nomeadamente Grifo (*Gyps fulvus*) e Abutre negro (*Aegypius monachus*); o terceiro era constituído pelas duas espécies de Peneireiros existentes na Península Ibérica, Peneireiro das torres (*Falco naumanni*) e Peneireiro vulgar (*Falco tinnunculus*); e ao grupo das nocturnas pertenciam as espécies da Ordem *Strigiformes*, Bufo real (*Bubo bubo*), Bufo pequeno (*Asio otus*), Mocho galego (*Athene noctua*), Coruja das torres (*Tyto alba*) e Coruja do mato (*Strix aluco*).

Para o estudo da relação entre as variáveis qualitativas foram realizadas Tabelas de contigência (procedimento CROSSTABS) e para contrastar a independência ou influência entre duas variáveis qualitativas, realizou-se o Teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson. Este teste usa a informação de cada célula da tabela de contigência da percentagem e os resíduos brutos não padronizados, para ajudar a descobrir os padrões dos dados que contribuem para um teste de qui-quadrado significativo (Everitt, 1992; Ferrán, 1996). Estes testes foram aplicados às variáveis clínicas de condição corporal (CC), sexo e idade.

No caso da CC, os animais foram classificados segundo uma escala de 0 a 5 (0 = caquético; 1 = emaciado, 2 = magro, 3 = normal, 4 = gordo e 5 = obeso). Para a sua análise estatística, foram agrupados em 3 categorias: magro, para os animais com uma CC inferior a 3; normal, para os animais com CC igual a 3 e gordo, para os animais com uma CC maior que 3.

Relativamente à variável sexo, as aves foram classificadas em fêmea, macho ou indeterminado, de acordo com as características do dimorfismo sexual existente em algumas espécies, sendo que a indeterminado correspondem os jovens em que as características do dimorfismo sexual não são ainda visíveis. Nas espécies em que o dimorfismo sexual não é tão evidente, foram realizadas sempre que possível, análises sanguíneas para sexagem dos exemplares.

Por fim, para a variável idade, os animais foram agrupados em 2 classes: jovens (animais antes da idade reprodutiva) e adultos (animais em idade reprodutiva), de forma a obtermos uma melhor informação estatística.

Em toda a análise dos dados obtidos foi considerado um intervalo de confiança de 95% e como tal as diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

#### A – Características hematológicas

Na tabela 4 são apresentados a média, desvio padrão e valores mínimos e máximos de hematocrito (Hct) e contagem total de eritrócitos (TRBC) nas diferentes espécies, famílias e ordens. Com excepção das Águias de Bonelli (*Aquila fasciata*, n=16), Bufo reais (*Bubo bubo*, n=8) e Corujas do mato (*Strix aluco*, n=2), todas as espécies apresentam valores de Hct dentro dos parâmetros de normalidade para a generalidade das aves, ou seja, entre 35-55% (Campbell, 1995).

No caso das Águias de Bonelli (*Aquila fasciata*) os valores médios de Hct são coincidentes com o valor mínimo de normalidade (35%). Tal como referido anteriormente neste trabalho, na ausência de patologias, numerosos factores fisiológicos podem influenciar os parâmetros sanguíneos das aves silvestres, entre os quais a época do ano. Consoante a estação, ocorre uma flutuação dos níveis de eritrócitos, sendo que a Primavera e o Verão estão associados a valores diminuídos de Hct (Clark *et al.*, 2009; Fromont, 1993). Nesta espécie em particular, este factor é provavelmente o mais importante para justificar os valores obtidos, já que todos os exemplares, de idade adulta, foram analisados antes da primeira semana de Outubro, precisamente no final do período de Verão. Por outro lado, 2009 foi um ano com temperaturas muito elevadas, com uns meses de Setembro e Outubro muito cálidos quando comparados com o mesmo período de outros anos. O mês de Outubro foi mesmo considerado pelos meteorologistas o 4º mês de Outubro mais quente desde 1971 na Comunidade de Madrid (AEMET, 2009) o que pode justificar os baixos valores de Hct encontrados nesta espécie nesta altura do ano.

Em relação aos Bufo reais (*Bubo bubo*) os valores de Hct estão no limite mínimo de normalidade para a generalidade das aves e abaixo dos valores médios de referência para esta espécie (ver Anexo VI - Valores hematológicos de referência das espécies estudadas). Neste caso, 7 dos 8 exemplares analisados estavam parasitados (Tab.8) e 4 dos quais foram vítimas de trauma, apresentando valores de hematocrito abaixo de 35% no momento da sua entrada no Hospital de animais selvagens do GREFA. O facto de serem animais considerados clinicamente doentes, faz com que os valores obtidos sejam difíceis de analisar de forma clara e objectiva, já que podem sofrer influência de numerosos factores não considerados neste estudo. O mesmo acontece com as duas Corujas do mato (*Strix aluco*) analisadas. Por um lado, a existência de apenas dois exemplares, ambos parasitados, invalida um estudo mais profundo sobre esta espécie; por outro lado, um dos indivíduos deu entrada no Hospital do GREFA em estado de choque, com múltiplas lesões

resultantes de um trauma por atropelamento e com um valor de Hct de 24%, possivelmente associado à hemorragia resultante do trauma sofrido.

Tabela 4. Valores médios de hematócrito (Hct) e contagem total de eritrócitos (TRBC) por espécie, família e ordem

	Hct (%)			TRBC ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )		
	<i>n</i>	Média $\pm$ desvio padrão	Mínimo e máximo	<i>n</i>	Média $\pm$ desvio padrão	Mínimo e máximo
Águia Real	4	42,00 $\pm$ 5,16	36,00-48,00	3	2,89 $\pm$ 0,62	2,18-3,29
Águia de Bonelli	16	35,00 $\pm$ 4,94	28,00-47,00	3	1,86 $\pm$ 0,99	1,20-2,99
Águia Cobreira	1	45,00 $\pm$ 0,00	-	2	2,42 $\pm$ 0,52	2,05-2,79
Milhafre Real	10	42,00 $\pm$ 6,39	28,00-49,00	10	2,26 $\pm$ 0,47	1,50-2,93
Águia de asa redonda	11	38,00 $\pm$ 6,83	23,00-46,00	10	2,08 $\pm$ 0,65	1,15-3,00
Abutre negro	8	40,00 $\pm$ 5,21	30,00-45,00	8	1,84 $\pm$ 0,56	1,12-2,85
Grifo	10	41,00 $\pm$ 4,10	36,00-48,00	5	2,21 $\pm$ 0,23	1,97-2,68
<b>Total Accipitridae</b>	<b>60</b>	<b>39,00 <math>\pm</math> 6,02</b>	<b>23,00-49,00</b>	<b>41</b>	<b>2,15 <math>\pm</math> 0,59</b>	<b>1,12-3,29</b>
Peneireiro das torres	75	46,00 $\pm$ 5,23	34,00-55,00	64	3,06 $\pm$ 0,69	1,69-4,70
Peneireiro vulgar	3	46,00 $\pm$ 3,60	43,00-50,00	3	3,40 $\pm$ 0,07	3,34-3,47
<b>Total Falconidae</b>	<b>78</b>	<b>46,00 <math>\pm</math> 3,66</b>	<b>34,00-55,00</b>	<b>67</b>	<b>3,07 <math>\pm</math> 0,68</b>	<b>1,69 – 4,70</b>
<b>Ordem</b>						
<b>Falconiformes</b>	<b>138</b>	<b>43,00 <math>\pm</math> 6,07</b>	<b>23,00-55,00</b>	<b>108</b>	<b>2,72 <math>\pm</math> 0,79</b>	<b>1,12-4,70</b>
Coruja das torres	13	42,00 $\pm$ 5,37	32,00-54,00	9	2,24 $\pm$ 0,52	1,75-3,11
<b>Total Tytonidae</b>	<b>13</b>	<b>42,00 <math>\pm</math> 5,37</b>	<b>32,00-54,00</b>	<b>9</b>	<b>2,24 <math>\pm</math> 0,52</b>	<b>1,75-3,11</b>
Bufo real	8	35,00 $\pm$ 9,70	20,00-50,00	5	1,42 $\pm$ 0,68	0,64-2,40
Mocho galego	3	41,00 $\pm$ 7,57	36,00-50,00	0	-	-
Coruja do mato	2	32,00 $\pm$ 11,31	24,00-40,00	2	1,65 $\pm$ 0,74	1,12-2,18
Bufo pequeno	1	38,00 $\pm$ 0,00	-	1	2,67 $\pm$ 0,00	-
<b>Total Strigidae</b>	<b>14</b>	<b>36,00 <math>\pm</math> 8,91</b>	<b>20,00-50,00</b>	<b>8</b>	<b>1,63 <math>\pm</math> 0,73</b>	<b>0,64-2,67</b>
<b>Ordem</b>						
<b>Strigiformes</b>	<b>27</b>	<b>39,00 <math>\pm</math> 7,92</b>	<b>20,00-54,00</b>	<b>17</b>	<b>1,95 <math>\pm</math> 0,68</b>	<b>0,64-3,11</b>
<b>TOTAL</b>	<b>165</b>	<b>42,00 <math>\pm</math> 6,93</b>	<b>34,00-55,00</b>	<b>125</b>	<b>2,61 <math>\pm</math> 0,73</b>	<b>0,64-4,70</b>

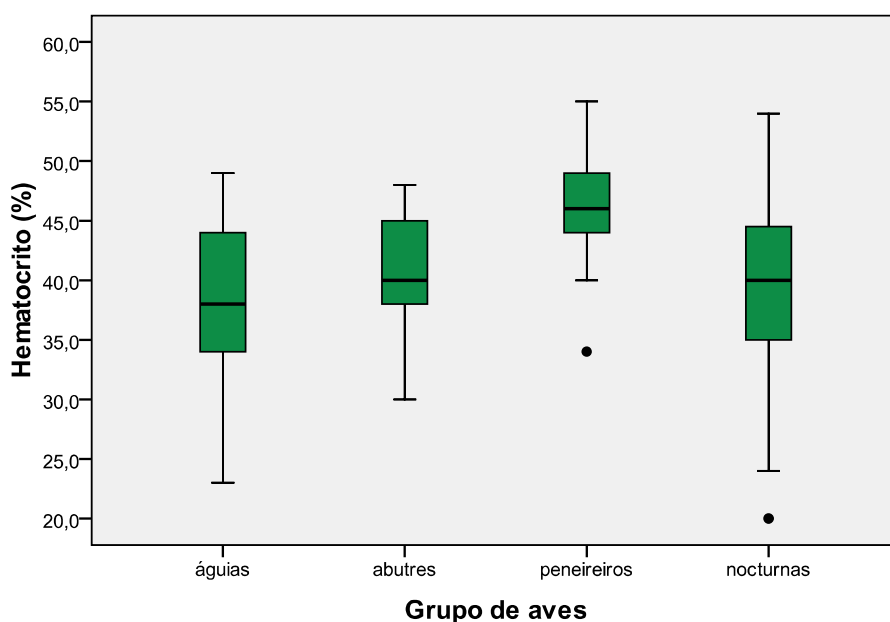
No que diz respeito aos valores médios de TRBC (Tab.4), apenas as Águias reais (*Aquila chrysaetos*, n=3), os Bufos reais (*Bubo bubo*, n=5) e as Corujas do mato (*Strix aluco*, n=2) apresentaram desvios relativamente aos valores de referência de cada uma das espécie (ver Anexo VI - Valores hematológicos de referência das espécies estudadas).

Relativamente às Águias reais (*Aquila chrysaetos*), os valores obtidos no nosso estudo foram bastante superiores aos observados nos estudos de Nazifi *et al.* (2008), que utilizava um número de exemplares bastante superior (n=21), mas muito próximos aos obtidos por Polo *et al.* (1992), com um número indivíduos bastante mais reduzido (n=5).

No caso dos Bufos reais (*Bubo bubo*) e das Corujas das torres (*Strix aluco*), as alterações encontradas voltam a estar relacionadas com o mencionado anteriormente para o Hct, já que os animais de ambas as espécies, foram hospitalizados por trauma e deram entrada no hospital do GREFA com valores de TRBC bastante diminuídos, possivelmente relacionados com as hemorragias e/ou com as parasitoses de que padeciam.

A tabela 5 ilustra a distribuição dos dados de Hct e TRBC dos quatro grupos estatísticos estudados. Os valores médios de Hct e TRBC estão dentro dos valores considerados normais para a generalidade das espécies, no entanto existem diferenças evidentes entre os valores médios obtidos para cada um dos 4 grupos (Fig. 7). Foram encontradas diferenças altamente significativas entre os diferentes grupos, tanto no que diz respeito ao Hct (Kruskal-Wallis,  $P < 0,001$ ) como no que diz respeito ao TRBC (Kruskal-Wallis,  $P < 0,001$ ).

Figura 7. Média e desvio padrão dos valores de hematocrito nos diferentes grupos de aves estudados





No caso do Hct não foram encontradas diferenças significativas relacionadas com a idade (Mann-Whitney,  $P=0,678$ ) ou sexo (Mann-Whitney,  $P=0,942$ ), mas foram observadas diferenças significativas relacionadas com a presença de hemoparasitas (Mann-Whitney,  $P=0,008$ ). Tal como se verificou para o Hct, também no caso TRBC não foram encontradas diferenças significativas relacionadas com a idade (Mann-Whitney,  $P=0,719$ ) ou sexo (Mann-Whitney,  $P=0,237$ ) e foram observadas diferenças significativas relacionadas com a presença de hemoparasitas (Mann-Whitney,  $P=0,001$ )

Tabela 5. Valores médios de hematocrito (Hct) e contagem total de eritrócitos (TRBC) por grupo de aves

	<i>n</i>	Hct (%)		<i>n</i>	TRBC ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	
		Média $\pm$ desvio padrão	Mínimo e máximo		Média $\pm$ desvio padrão	Mínimo e máximo
Águias	42	38,00 $\pm$ 6,47	23,00-49,00	28	2,23 $\pm$ 0,63	1,15-3,29
Abutres	18	41,00 $\pm$ 4,49	30,00-48,00	13	1,98 $\pm$ 0,49	1,12-2,85
Peneireiros	78	46,00 $\pm$ 3,66	34,00-55,00	67	3,07 $\pm$ 0,68	1,69-4,70
Nocturnas	27	39,00 $\pm$ 7,92	20,00-54,00	17	1,95 $\pm$ 0,68	0,64-3,11
<b>TOTAL</b>	<b>165</b>	<b>42,00 <math>\pm</math> 6,93</b>	<b>34,00-55,00</b>	<b>125</b>	<b>2,61 <math>\pm</math> 0,73</b>	<b>0,64-4,70</b>

A existência de hemoparasitas, tanto na população de águias como na população de nocturnas, pode realmente ser importante para justificar os valores de Hct mais baixos nestes dois grupos, assim como dos valores médios de TRBC mais baixos no grupo das nocturnas. No entanto, o grupo de peneireiros, sem dúvida o grupo com maior número de animais parasitados, foi aquele que demonstrou possuir valores de Hct e TRBC mais elevados. Pelo facto deste grupo ser constituído principalmente pelos elementos da espécie Peneireiros das torres (*Falco naumanni*) e por esta ser, sem dúvida, a espécie com maior representatividade na nossa amostra, decidimos estudá-la em particular mais à frente neste trabalho.

Relativamente aos resultados das contagens totais de leucócitos (TWBC), resumidos na Tabela 6, todas as espécies apresentaram valores médios dentro dos parâmetros de normalidade para a generalidade das aves com contagens diferenciais granulocíticas, ou seja, entre 5,00-25,00  $\times 10^3/\mu\text{l}$  (Samour & Pendl, 2009b), com excepção dos Peneireiros das torres (*Falco naumanni*,  $n=82$ ), com um TWBC de 4,24  $\times 10^3/\mu\text{l}$ . No entanto, para além desta espécie, as Águias reais (*Aquila chrysaetos*,  $n=6$ ), os Peneireiros vulgares (*Falco tinnunculus*,  $n=3$ ) e as Corujas das torres (*Tyto alba*,  $n=8$ ) apresentaram valores de TWBC

bastante afastados dos valores médios de referência para cada uma das espécies em questão (ver Anexo VI - Valores hematológicos de referência das espécies estudadas).

Tabela 6. Valores médios, mínimos e máximos de TWBC por espécie, família e ordem

	<i>n</i>	TWBC ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	
		Média $\pm$ desvio padrão	Mínimo e máximo
Águia Real	6	13,21 $\pm$ 1,72	10,75-14,74
Águia de Bonelli	24	9,20 $\pm$ 3,28	5,25-16,00
Águia Cobreira	4	16,78 $\pm$ 10,99	7,50-32,00
Milhafre Real	11	13,15 $\pm$ 6,78	6,38-29,48
Águia de asa redonda	11	12,14 $\pm$ 5,41	5,50-24,86
Abutre negro	8	17,62 $\pm$ 6,14	9,46-29,92
Grifo	9	12,32 $\pm$ 3,68	7,00-18,26
<b>Total Accipitridae</b>	<b>73</b>	<b>12,29 <math>\pm</math> 5,65</b>	<b>5,25-32,00</b>
Peneireiro das torres	82	4,24 $\pm$ 1,70	1,10-10,00
Peneireiro vulgar	3	15,08 $\pm$ 1,76	3,74 -35,33
<b>Total Falconidae</b>	<b>85</b>	<b>4,62 <math>\pm</math> 3,77</b>	<b>1,10-35,33</b>
<b>Ordem</b>			
<b>Falconiformes</b>	<b>158</b>	<b>8,17 <math>\pm</math> 6,08</b>	<b>1,10-35,33</b>
Coruja das torres	11	6,48 $\pm$ 2,03	1,98-9,25
<b>Total Tytonidae</b>	<b>11</b>	<b>6,48 <math>\pm</math> 2,03</b>	<b>1,98-9,25</b>
Bufo real	8	8,78 $\pm$ 3,66	3,25-13,86
Mocho galego	3	11,08 $\pm$ 1,81	9,00-12,25
Coruja do mato	2	6,05 $\pm$ 0,78	5,50-6,60
Bufo pequeno	1	15,18 $\pm$ 0,00	-
<b>Total Strigidae</b>	<b>14</b>	<b>9,34 <math>\pm</math> 3,60</b>	<b>3,25-15,18</b>
<b>Ordem</b>			
<b>Strigiformes</b>	<b>25</b>	<b>8,08 <math>\pm</math> 3,29</b>	<b>1,98-15,18</b>
<b>TOTAL</b>	<b>183</b>	<b>8,16 <math>\pm</math> 5,77</b>	<b>1,10-35,33</b>

No caso das Águias reais (*Aquila chrysaetos*), os valores obtidos no nosso estudo foram bastante inferiores aos observados nos estudos de hematologia desta espécie, mais recentemente realizados (Nazifi *et al.*, 2008). Na nossa experiência no GREFA, aves de rapina com TWBC de  $26,28 \times 10^3/\mu\text{l}$ , limite máximo obtido por Nazifi *et al.* (2008), demonstram sinais clínicos de reduzido bem-estar, como perda de apetite e diminuição do ganho de peso, muitas vezes associadas a infecções sistémicas. Por outro lado, e tal como acontecia com o TRBC, o estudo de Nazifi *et al.* (2008) foi realizado com um número de exemplares bastante superior ( $n=21$ ) também neste parâmetro, o que pode ser suficiente para justificar as diferenças observadas. Uma vez mais, quando comparados com outros estudos com um número de indivíduos mais baixo (Polo *et al.*, 1992), os valores encontrados no nosso trabalho apresentam-se bastante mais próximos das médias obtidas. Shen *et al.* (2008), descrevem uma média de TWBC de  $6,02 \times 10^3/\mu\text{l}$  para os Peneireiros vulgares (*Falco tinnunculus*), um valor bastante inferior ao do presente estudo para a mesma espécie ( $15,08 \times 10^3/\mu\text{l}$ ). A principal diferença entre estes dois estudos, para além do número superior de animais usados por Shen *et al.* (2008), foi o facto de dentro da nossa pequena população ( $n=3$ ), existir um animal clinicamente doente, vítima de trauma por disparo, com uma contagem de TWBC superior a qualquer outro animal de toda a amostra considerada neste trabalho ( $35,33 \times 10^3/\mu\text{l}$ ). Este amplo intervalo de TWBC ( $3,74$ - $35,33 \times 10^3/\mu\text{l}$ ), faz então aumentar a média obtida para esta espécie e justifica as diferenças encontradas entre ambos os estudos.

Por último, no caso das Corujas das torres (*Tyto alba*), os nossos valores foram bastante inferiores aos referidos por Samour (2000) para a mesma espécie, mas bastante próximos das restantes médias das outras espécies de nocturnas estudadas. Neste caso, ambos os estudos foram realizados com animais clinicamente saudáveis e com um número de indivíduos relativamente semelhante ( $n=8$ , no nosso trabalho e  $n=10$ , nos estudos de Samour), pelo que as diferenças existentes podem ser justificadas pelas técnicas de contagem utilizadas ou por um conjunto de numerosos factores ambientais desconhecidos, como o manejo, características das instalações, agrupamento social, entre outros.

Intervalos alargados de TWBC, como observados em praticamente todas as espécies estudadas, têm sido referidos em várias espécies de aves de rapina, tanto em jovens como em adultos (Bowerman, Stickle, Sikarskie & Giesy, 2000; Limiñana, López-Olvera, Gallardo, Fordham & Urios, 2009; Phalen *et al.*, 1995). Estes intervalos tão amplos podem ser atribuídos a factores como manejo, condições ambientais e condição nutricional (Campbell, 1995).

A tabela 7 ilustra a distribuição dos dados de TWBC dos quatro grupos estatísticos estudados.

Os valores médios de TWBC estão dentro dos valores considerados normais para a generalidade das espécies granulocíticas nos grupos das águias, abutres e nocturnas, no entanto o grupo dos peneireiros apresenta valores médios abaixo da normalidade. Por outro lado existem diferenças evidentes entre os valores médios obtidos para cada um dos 4 grupos. Foram encontradas diferenças altamente significativas a 95% no que diz respeito ao TWBC entre as diferentes espécies (Kruskal-Wallis,  $P < 0,001$ ). Não foram encontradas diferenças significativas relacionadas com a idade (Mann-Whitney,  $P = 0,487$ ) ou sexo (Mann-Whitney,  $P = 0,566$ ), mas foram observadas diferenças altamente significativas relacionadas com a presença de hemoparasitas (Mann-Whitney,  $P < 0,001$ ).

Tabela 7. Valores médios de contagem total de leucócitos (TWBC) por grupo de aves

	<i>n</i>	TWBC ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	
		Média $\pm$ desvio padrão	Mínimo e máximo
Águias	56	11,52 $\pm$ 5,51	5,25-32,00
Abutres	17	14,81 $\pm$ 5,54	7,00-29,92
Peneireiros	85	4,63 $\pm$ 3,77	1,10-35,33
Nocturnas	25	8,08 $\pm$ 3,29	1,98-15,18
<b>TOTAL</b>	<b>183</b>	<b>8,16 <math>\pm</math> 5,77</b>	<b>1,10-35,33</b>

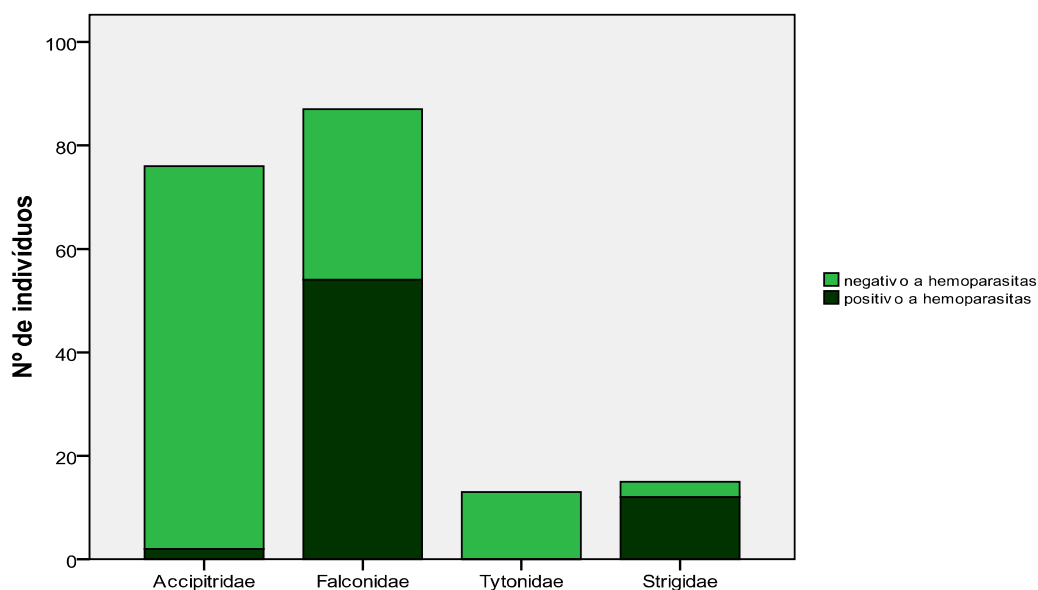
Uma vez mais, a presença de hemoparasitas aparece associada aos grupos com valores médios mais baixos, neste caso os Peneireiros e as Nocturnas, os dois mais parasitados. Tal como já referido anteriormente, a espécie *Falco naumanni* é a principal constituinte do grupo dos peneireiros e a espécie mais representada na nossa amostra, sendo por isso considerada de forma individual mais à frente neste trabalho.

## B – Pesquisa de hemoparasitas

As espécies de hospedeiros observadas, os géneros de hemoparasitas encontrados e as respectivas prevalências aparentes foram resumidas na Tabela 8.

Dos 191 animais analisados, 68 foram positivos à pesquisa de hemoparasitas, o que corresponde a 35,6% da população estudada, sendo esta proporção de 34,4% para os Falconiformes e de 42,9% para os Strigiformes. A diferença de taxa de prevalência existente entre Falconiformes e Strigiformes não foi significativa ( $P=0,385$ ). Foram, no entanto, observadas diferenças altamente significativas ( $P<0,001$ ) entre as quatro famílias estudadas (Accipitridae, Falconidae, Tytonidae e Strigidae) (Fig.8) e entre os quatro grupos estatísticos criados para a análise dos resultados (águias, abutres, peneireiros e nocturnas), sendo o grupo dos peneireiros o mais afectado pelas hemoparasitoses. Por outro lado, não foram encontradas quaisquer diferenças significativas na prevalência aparente consoante o género ( $P=0,869$ ), idade ( $P=0,502$ ) ou status (cativo vs vida livre) ( $P=0,841$ ).

Figura 8. Distribuição das aves positivas/negativas a hemoparasitas nas quatro famílias estudadas



Em trabalhos efectuados em aves de rapina em Portugal, foram assinalados 9,9% de animais positivos na ordem dos Falconiformes e 63,6% de animais positivos na ordem Strigiformes, sendo estes últimos também os mais parasitados, embora com valores bastante diferentes aos registados no nosso estudo (Santos, Pereira, Melo & Madeira de Carvalho, 2008). Fromont (1993), encontrou em aves de rapina alojadas em Centros de recuperação franceses, uma taxa de prevalência muito semelhante à do nosso trabalho, tanto em Falconiformes (29%) como em Strigiformes (43%).

Tabela 8. Espécies de hospedeiros, gêneros de hemoparasitas encontrados e percentagem de positivos

Hospedeiro	n	Infectados (%)	Infectados por <i>Leucocytozoon</i> (%)	Infectados por <i>Haemoproteus</i> (%)	Infectados por <i>Plasmodium</i> (%)	Infectados por <i>Trypanosoma</i> (%)	Infectados por hemoparasita não identificado (%)
Águia Real	6	0	0	0	0	0	0
Águia de Bonelli	26	0	0	0	0	0	0
Águia Cobreira	4	0	0	0	0	0	0
Milhafre Real	11	0	0	0	0	0	0
Águia de asa redonda	11	2	2 (18,2)	0	1 (9,1)	0	0
<b>Total Águias</b>	<b>58</b>	<b>2</b>	<b>2 (3,4)</b>	<b>0</b>	<b>1 (1,72)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Abutre negro	8	0	0	0	0	0	0
Grifo	10	0	0	0	0	0	0
<b>Total Abutres</b>	<b>18</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Total Accipitridae</b>	<b>76</b>	<b>2 (2,6)</b>	<b>2 (2,6)</b>		<b>1 (1,3)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Peneireiro das torres	84	52 (61,9)	0	7 (8,3)	37 (44,0)	0	8 (9,5)
Peneireiro vulgar	3	2 (66,7)	0	2 (66,7)	0	0	0
<b>Total peneireiros</b>							
<b>Total Falconidae</b>	<b>87</b>	<b>54 (62,1)</b>	<b>0</b>	<b>9 (10,3)</b>	<b>37 (42,5)</b>	<b>0</b>	<b>8 (9,2)</b>
<b>Ordem Falconiformes</b>	<b>163</b>	<b>56 (34,4)</b>	<b>2 (1,2)</b>	<b>9 (5,52)</b>	<b>38 (23,3)</b>	<b>0</b>	<b>8 (4,9)</b>
Coruja das torres	13	0	0	0	0	0	0
<b>Total Tytonidae</b>	<b>13</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Bufo real	8	7 (87,5)	6 (75,0)	1 (14,3)	1 (14,3)	0	0
Mocho galego	3	2 (66,7)	2 (66,7)	0	0	0	1 (33,3)
Coruja do mato	3	2 (66,7)	1 (33,3)	1 (33,3)	0	1 (33,3)	0
Bufo pequeno	1	1 (100)	1 (100)	0	0	0	0
<b>Total Strigidae</b>	<b>15</b>	<b>12 (80,0)</b>	<b>10 (66,7)</b>	<b>2 (13,3)</b>	<b>1 (6,7)</b>	<b>1 (6,7)</b>	<b>1 (6,7)</b>
<b>Total nocturnas</b>	<b>28</b>	<b>12 (42,9)</b>	<b>10 (35,7)</b>	<b>2 (8,0)</b>	<b>1 (3,6)</b>	<b>1 (3,6)</b>	<b>1 (3,6)</b>
<b>Ordem Strigiformes</b>	<b>28</b>	<b>12 (42,9)</b>	<b>10 (35,7)</b>	<b>2 (8,0)</b>	<b>1 (3,6)</b>	<b>1 (3,6)</b>	<b>1 (3,6)</b>
<b>TOTAL</b>	<b>191</b>	<b>68 (35,6)</b>	<b>12 (6,3)</b>	<b>11 (5,8)</b>	<b>39 (20,4)</b>	<b>1 (0,5)</b>	<b>9 (4,7)</b>

Em Espanha, Muñoz, Ferrer, Molina e Adlard (1999) encontraram uma taxa de prevalência superior em Falconiformes (46,3%), mas inferior em Strigiformes (30,5%).

Das 9 espécies de rapinas diurnas examinadas, apenas 3 foram positivas à pesquisa de hemoparasitas. Em comparação, 4 das 5 espécies de rapinas noturnas estudadas encontravam-se infectadas por hemoprotozoários.

Na família Accipitridae não foram encontrados hemoparasitas nas Águias reais (*Aquila chrysaetos*, n=6), Águias de Bonelli (*Aquila fasciata*, n=26), Águias cobreiras (*Circaetus gallicus*, n=4), Milhafres reais (*Milvus milvus*, n=11), Abutres negros (*Aegypius monachus*, n=8) e Grifos (*Gyps fulvus*, n=10), sendo a única espécie afectada a Águia de asa redonda (*Buteo buteo*, n=11). Nos rastreios franceses, esta foi a espécie que apresentou uma taxa de prevalência mais elevada, embora com níveis muito superiores aos registados na nossa pesquisa (44% e 18,2%, respectivamente).

Na família Falconidae, foram observados hemoparasitas nas duas espécies estudadas, sendo que os Peneireiros das torres (*Falco naumanni*, n=84) foram principalmente infectados por *Plasmodium* spp. (44,0%), enquanto que os Peneireiros vulgares (*Falco tinnunculus*) foram principalmente infectados por *Haemoproteus* spp. (66,7%).

Na ordem Strigiformes, as Corujas das torres (*Tyto alba*, n=13) foram a única espécie negativa à pesquisa de hemoparasitas. Também nos estudos de Fromont (1993), isto se verificou (*Tyto alba*, n=13). Por outro lado, todas as espécies pertencentes à família Strigidae foram positivas a pelo menos um género parasitário, sendo o género *Leucocytozoon* o mais frequentemente encontrado nas aves infectadas (66,7%).

A variação da prevalência de cada género parasitário nas diferentes espécies, pode ser explicado pela sensibilidade de cada umas das espécies aos parasitas em questão, mas também pela presença ou ausência do vector responsável pela sua transmissão na região estudada. *Plasmodium* foi o género de hemoparasita mais observado nos animais submetidos a este estudo, afectando 39 dos 191 animais analisados, o que corresponde a uma prevalência de 20,4%. A sua presença foi particularmente expressiva nas rapinas diurnas, nomeadamente nos Peneireiros das torres (*Falco naumanni*), onde infectou 37 dos 52 animais positivos a hemoparasitoses. Tanto quanto é de nosso conhecimento, em nenhum outro estudo realizado na Europa foram encontradas prevalências tão elevadas de *Plasmodium* spp. em aves de rapina (Ortego, Calabuig, Cordero, Aparicio, 2007a; Ortego, Cordero, Aparicio e Calabuig, 2007b; Kucera, 1981). Trabalhos realizados por Ortega *et al.* (2007a e 2007b) apresentam uma taxa de prevalência de *Plasmodium* entre 5 e 8,2% numa população reprodutora de Peneireiros das torres (*Falco naumanni*) em Castilla la Mancha, Espanha Central. Kucera (1981), citado por Krone *et al.* (2001), encontrou uma taxa de prevalência deste parasita de 2,3% em Strigiformes (n=178), mas não diagnosticou a sua presença em Falconiformes (n=333).

A elevada prevalência de *Plasmodium* spp. nos Peneireiros das torres (*Falco naumanni*) pode ser justificada pelo facto de se tratar de uma espécie de ave de rapina colonial, mantida em cativeiro no GREFA em instalações comunitárias, o que pode facilitar e aumentar a taxa de transmissão do hemoparasita pelo vector, aumentando a sua expressão dentro desta espécie (Tella, 2002). Por outro lado, os Peneireiros das torres (*Falco naumanni*), são uma espécie migratória de longa distância, e como tal podem estar expostos a parasitas de malária das aves tanto da Europa como de África (Ortego *et al.*, 2007a). Como tal, provavelmente esta espécie apresenta um maior risco de se encontrar e ser infectada com parasitas destas duas faunas distintas, podendo sofrer uma maior pressão selectiva por parte destes agentes, em comparação com espécies não migratórias (Ortego *et al.*, 2007b; Waldenström, Bensch, Hasselquist & Ottosson, 2002). Sempre que um novo animal é introduzido nesta população, aumenta o risco de infecção para todos os restantes, pois não sabemos se o animal está ou não infectado. Há ainda a considerar a presença do vector na zona estudada, o Monte del Pilar (40° 28'06.37 N, 3° 50'25.87 O), onde se situam as instalações do GREFA, que pelas suas características ecológicas, confere a estes agentes um ambiente extremamente propício ao seu desenvolvimento. Praticamente qualquer zona de água, doce ou salgada, pode ser utilizada pelas larvas dos mosquitos culicídeos dos géneros *Culex* e *Aedes* (principais vectores de *Plasmodium*), com excepção de cursos de água rápidos e lagos, particularmente se habitados por peixes larvicidas. A existência de numerosos arroios por todo o Monte del Pilar e de vários charcos dentro das instalações do GREFA, preenche assim uma das principais necessidades do ciclo biológico dos vectores responsáveis pela transmissão de *Plasmodium*. Como as espécies deste parasita podem ser muito semelhantes entre si, podendo afectar aves de ordens e famílias diferentes, não podemos inferir quanto à especificidade do(s) parasita(s) encontrado(s) nestes animais.

O género *Leucocytozoon* foi o género mais encontrado em aves de rapina de hábitos nocturnos, infectando 10 das 15 aves estudadas dentro deste grupo (66,7%). Este dado vai ao encontro da hipótese lançada por Taft (1994), de que este grupo de aves teria uma maior prevalência de infecção por *Leucocytozoon* spp., uma vez que os vectores simuliídeos são diurnos, realizando as suas refeições de sangue quando estas aves estão inactivas. Por outro lado, 6 das 10 aves nocturnas infectadas por estes parasitas eram Búfos reais (*Bubo bubo*, n=8), o que corresponde a 75% dos animais desta espécie. Esta elevada prevalência pode estar relacionada com questões da sua ecologia, particularmente dentro da comunidade de Madrid: tal como referido anteriormente (Tab.1 – Ecologia das espécies de aves de rapina estudadas), os Búfos reais habitam preferencialmente zonas arborizadas densas e próximas de cursos de água. O habitat eleito por esta espécie torna-se, desta forma, o local ideal para o desenvolvimento dos vectores envolvidos na transmissão de *Leucocytozoon* spp., já que os insectos da família Simuliidae depositam os seus ovos em



pedras ou vegetação submersas ou à superfície da água, os estádios larvares são totalmente aquáticos e, quando em repouso, os adultos escolhem as árvores e outros arbustos para pousar (Lehane, 2005).

Foram encontrados três casos de infecção mista: um por *Leucocytozoon* sp. e *Plasmodium* sp. numa Águia de asa redonda (*Buteo buteo*), um por *Haemoproteus* sp. e *Trypanosoma* sp. numa Coruja do mato (*Strix aluco*) e outro por *Leucocytozoon* sp. e *Haemoproteus* sp. num Bufo real (*Bubo bubo*). Todas as associações parasita-hospedeiro já se encontravam descritas na literatura (Fromont, 1993; Valkiūnas *et al.*, 2004).

### C – O caso específico dos Peneireiros das torres (*Falco naumanni*) neste estudo

Por ser a população mais significativa da nossa amostra e por apresentar valores hematológicos com características específicas, esta espécie merece uma consideração especial.

Todos os animais incluídos neste estudo são animais pertencentes ao “Proyecto de cría en cautividad del Cernicalo primilla”, levado a cabo pelo GREFA e, uma vez por ano, antes da época de cria, são submetidos a análises hematológicas e a uma avaliação do estado geral. Os nossos resultados foram obtidos entre os meses de Janeiro e Fevereiro de 2010.

Como referido anteriormente, os valores de Hct e TRBC observados estão dentro dos valores de referência desta espécie (ver Anexo VI - Valores hematológicos de referência das espécies estudadas), no entanto os valores de TWBC, estão bastante diminuídos (Tab.9).

Tabela 9. Dados hematológicos da espécie Peneireiro das torres (*Falco naumanni*)

Parâmetros sanguíneos	n	Media ± desvio padrão	Mínimo e máximo
Hct (%)	75	46,00 ± 5,23	14,00-55,00
TRBC (x10 <sup>6</sup> /μl)	64	3,06 ± 0,69	1,69-4,70
TWBC (x10 <sup>3</sup> /μl)	82	4,24 ± 1,70	1,10-10,00
Heterófilos (10 <sup>3</sup> /μl)	75	2,77 ± 1,31	0,73-6,70
Percentagem de WBC		70	53-92
Eosinófilos (x10 <sup>3</sup> /μl)	75	0,04 ± 0,19	0,00-1,68
Percentagem de WBC		0,8	0-28
Linfócitos (x10 <sup>3</sup> /μl)	75	1,15 ± 0,76	0,16-5,35
Percentagem de WBC		27	6-54
Basófilos (x10 <sup>3</sup> /μl)	75	0,05 ± 0,08	0-0,51
Percentagem de WBC		1	0-7
Monócitos (x10 <sup>3</sup> /μl)	75	0,14 ± 0,12	0,00-0,80
Percentagem de WBC		3	0-11

Comparando os valores das diferentes populações celulares de leucócitos com os valores obtidos nos trabalhos de Montijano *et al.* (2004) e Prescott, Muñoz e Íñigo (2001), observamos que na nossa população de Peneireiros das torres (*Falco naumanni*), existe um

aumento na percentagem de heterófilos e uma diminuição na percentagem de linfócitos. O efeito do stress sobre as características hematológicas reflecte-se principalmente sobre as concentrações dos heterófilos e linfócitos, e pode estar associada a diferentes factores indutores de stress. O manejo a que são submetidos estes animais no dia em que se realizam as provas analíticas anuais, pode ser um dos principais factores de stress a influenciar os valores dos parâmetros sanguíneos. Os animais são capturados das suas instalações com a ajuda de uma rede e colocados em grupo dentro de transportadoras. São depois transportados até à enfermaria do Hospital do GREFA, onde cada animal é sujeito a uma exploração geral que pode demorar vários minutos.

No entanto, outros factores indutores de stress, relacionados com o modo de vida destes animais no Centro de Recuperação, podem justificar estas alterações. Estas aves estão alojadas em instalações colectivas, com dimensões e estruturas muito variadas, e agrupadas em grupos com diferente número de indivíduos (entre 2 a 20 aves) e emparelhamentos muito distintos (diferente número de fêmeas e machos por instalação). Por outro lado, todas as instalações desta espécie são exteriores, estando os animais sujeitos a variações extremas de temperatura, particularmente baixas na altura do ano em que foram realizadas as análises sanguíneas desta espécie. Vleck *et al.* (2000), referem a importância de numerosos factores indutores de stress nas alterações destes dois parâmetros hematológicos (heterófilos e linfócitos), entre os quais privação de água ou comida, temperaturas extremas, luz constante e exposição a novas situações sociais, sendo que normalmente múltiplos efeitos stressantes têm um efeito cumulativo (McFarlane & Curtis, 1989; McKee & Harrison, 1995).

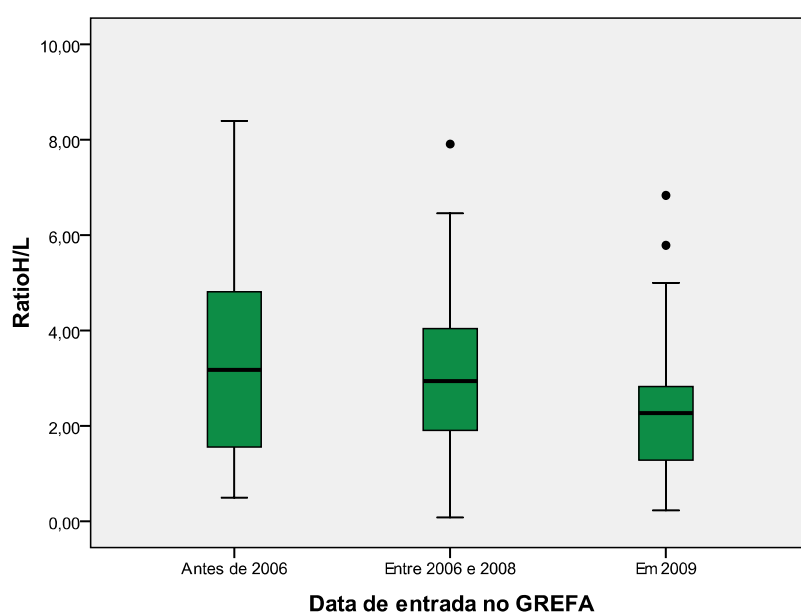
Com o intuito de avaliarmos a influência do stress sobre estes animais, analisamos o ratio heterófilos/linfócitos (Ratio H/L), considerado um excelente índice de medida para o stress crónico (Fig.8 e Tab.10).

Tabela 10. Valores do ratio H/L por ano de entrada no GREFA

Ano de entrada no GREFA	n	Ratio H/L	
		Média ± desvio padrão	Mínimo e máximo
Antes de 2006	30	3,24 ± 2,06	0,49-8,40
Entre 2006 e 2008	19	3,19 ± 1,88	0,80-7,91
Em 2009	25	2,58 ± 1,66	0,23-6,83
<b>TOTAL</b>	<b>74</b>	<b>3,17 ± 2,33</b>	<b>0,23-15,00</b>

As aves com ratio H/L mais elevado foram as pertencentes ao grupo de animais que deram entrada no GREFA antes do ano de 2006, ou seja, o grupo de animais mantido em cativeiro por mais tempo (Fig.9). Se por um lado estes animais poderiam estar mais habituados à manipulação e ao contacto frequente com humanos, são estes os animais mais sujeitos à cronicidade dos factores indutores de stress a que está exposta esta população, sejam eles o manejo, as condições das instalações, as alterações das situações sociais por entrada ou saída de um ou mais elementos, variações de temperatura, ou uma soma de todos eles. No entanto, as diferenças existentes entre os ratios H/L dos 3 grupos não foram estatisticamente significativas (Kruskal-Wallis,  $P=0,308$ ), nem positivamente relacionadas com a presença/ausência de hemoparasitas (Mann-Whitney,  $P=0,846$ ).

Figura 9. Média e desvio padrão do ratio H/L de acordo com o ano de entrada no GREFA



Quando analisada a possibilidade de existirem diferenças nos valores hematológicos nesta espécie provocadas pela existência de hemoparasitas, verificamos que nem o Hct ( $P=0,895$ ), nem o TRBC ( $P=0,370$ ) e o TWBC ( $P=0,512$ ) eram influenciados por esta variável. Da mesma forma, não foram encontradas diferenças significativas entre nenhum dos restantes parâmetros hematológicos relacionados com a presença de hemoparasitas.

Por outro lado, foram observadas diferenças significativas no TWBC ( $P=0,013$ ) consoante a idade das aves em estudo (Tab.11). Montijano *et al.* (2004) referem médias de TWBC mais altas nos jovens desta espécie, à semelhança do registado no nosso estudo.

Tabela 11. Valores das contagens totais de leucócitos (TWBC) em jovens e adultos de Peneireiro das torres (*Falco naumanni*)

	<i>n</i>	TWBC ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	
		Média $\pm$ desvio padrão	Mínimo e máximo
Jovens	23	5,07 $\pm$ 1,95	1,50-10,00
Adultos	59	3,92 $\pm$ 1,49	1,10-6,75
<b>TOTAL</b>	<b>82</b>	<b>4,24 <math>\pm</math> 1,70</b>	<b>1,10-10,00</b>

Tal como acontecia para a generalidade das espécies analisadas, também nos Peneireiros das torres (*Falco naumanni*) o sexo das aves parece não estar relacionado com as diferenças existentes nos parâmetros hematológicos, entre os indivíduos desta espécie: Hct ( $P=0,572$ ), TRBC ( $P=0,240$ ), TWBC ( $P=0,306$ ), heterófilos absolutos ( $P=0,311$ ) e em percentagem ( $P=0,942$ ), eosinófilos absolutos ( $P=0,564$ ) e em percentagem ( $P=0,498$ ), linfócitos absolutos ( $P=0,842$ ) e em percentagem ( $P=0,821$ ), basófilos absolutos ( $P=0,120$ ) e em percentagem e por fim, monocitos absolutos ( $P=0,067$ ) e em percentagem ( $P=0,111$ ).

No que diz respeito às hemoparasitoses, esta espécie apresentou uma taxa de prevalência de infecção de 61,9%, sendo uma das espécies mais parasitadas do nosso estudo.

Foi encontrada uma tendência para uma maior prevalência de infecção nas fêmeas do que nos machos (Fig.10). Embora geralmente os machos apresentem uma maior susceptibilidade a infecções parasitárias e uma menor capacidade de resposta imunológica, a prevalência de hematozoários pode ser, pelo menos sob determinadas condições, maior nas fêmeas (Tomé *et al.*, 2005). Trabalhos desenvolvidos por Korpimäki *et al.* (1993) demonstraram que essa diferença pode resultar de efeitos imunodepressores, relacionados com o esforço reprodutivo desempenhado pelas fêmeas. No entanto, as diferenças de prevalência encontradas entre os dois géneros não foram estatisticamente significativas ( $P=0,581$ ).

A percentagem de aves jovens positivas a hemoparasitas (65,2%) foi superior á percentagem de aves adultas na mesma situação (60,7%) (Fig.11), o que contraria os resultados obtidos por Ashford *et al.* (1990) e Krone *et al.* (2001). No entanto, a diferença existente entre os dois grupos etários não foi estatisticamente significativa ( $P=0,701$ ).

Figura 10. Distribuição dos Peneireiros das torres (*Falco naumanni*) positivos/negativos a hemoparasitas consoante o sexo

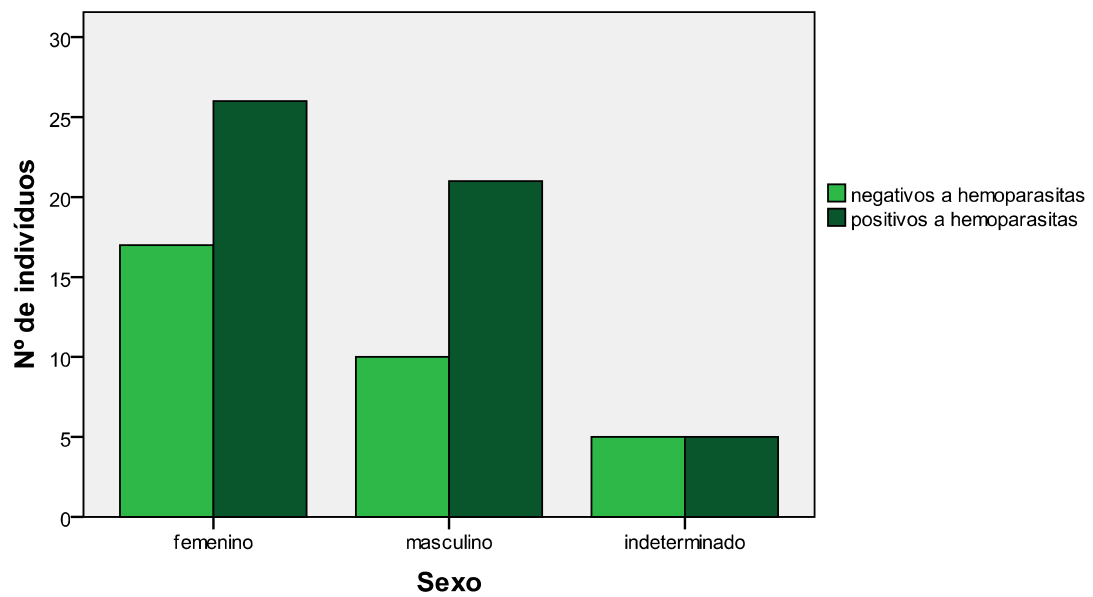
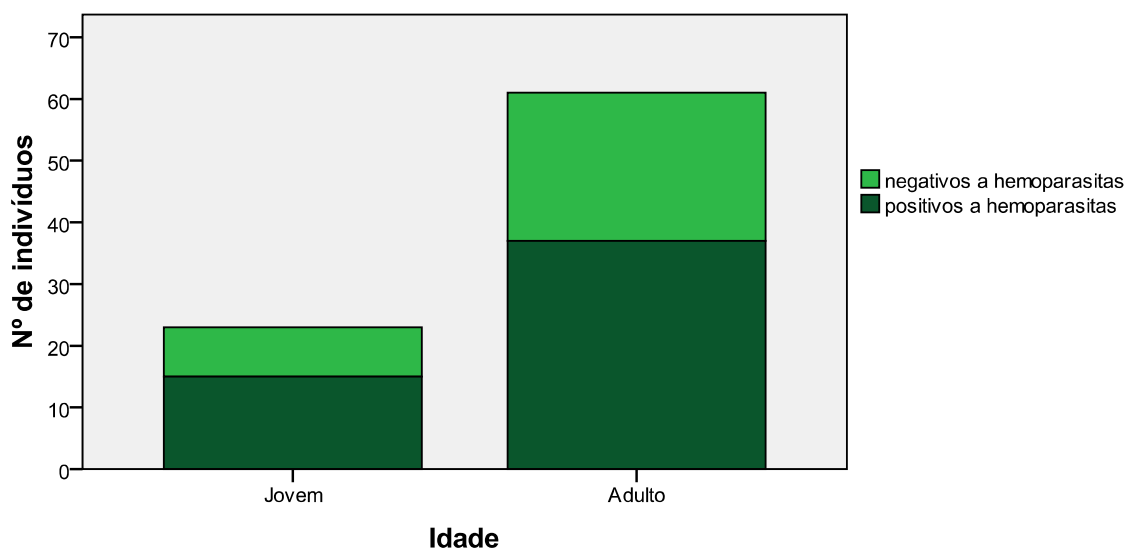


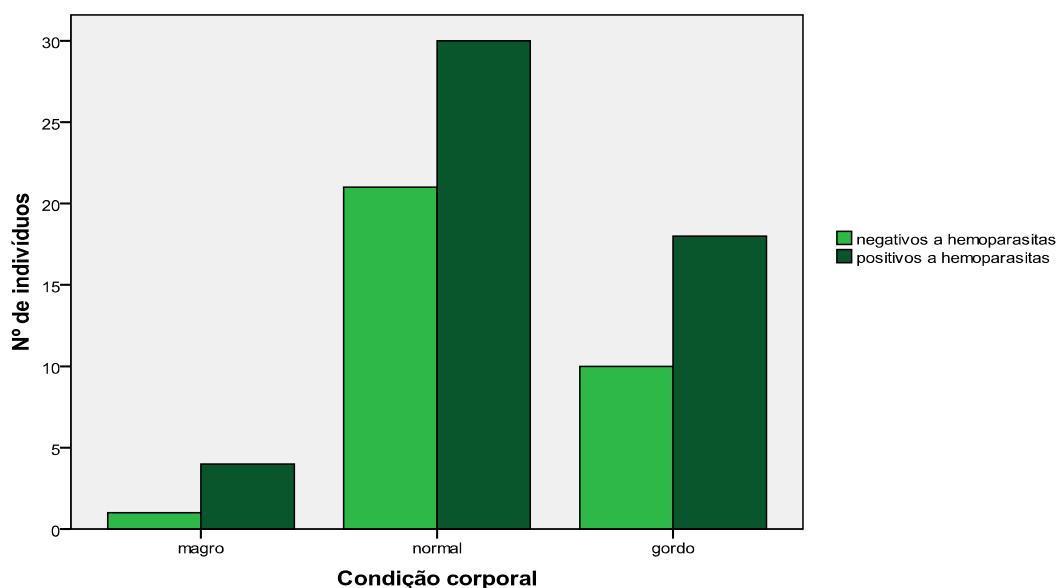
Figura 11. Distribuição dos Peneireiros das torres (*Falco naumanni*) positivos/negativos a hemoparasitas consoante a idade



O primeiro parâmetro a ser observado aquando da exploração de uma ave de rapina é a sua condição corporal (CC), avaliando por palpação a relação entre a quilha e os músculos peitorais. As aves são classificadas segundo uma escala de 0 a 5, correspondendo o 0 a caquécia e o 5 a obesidade. Neste estudo, agrupámos os Peneireiros das torres (*Falco naumanni*) em 3 categorias: magro, para os animais com uma CC inferior a 3; normal, para os animais com CC igual a 3 e gordo, para os animais com uma CC maior que 3.

No nosso estudo, a maioria dos animais infectados por hemoparasitas apresentava uma condição corporal normal (CC=3) ou acima do normal (CC=4 ou 5) (Fig.12), no entanto, tal como em vários outros estudos (Bennet, Caines & Bishop, 1988; Davidar & Morton, 1993) não foram observados efeitos directos do status parasitário (positivo vs negativo) sobre a CC ( $P=0,617$ ).

Figura 12. Distribuição da condição corporal em Peneireiros das torres (*Falco naumanni*) de acordo com a infecção por hemoparasitas



A associação entre parasitismo e CC pode ter sido mascarada por várias condições, entre as quais o facto destes animais se encontrarem em cativeiro, com comida *ad libitum* e o facto da recolha das amostras desta espécie ter sido feita no período pré-cria. Dos 28 animais existentes na categoria de CC “gordo”, 18 eram fêmeas, 11 das quais parasitadas. No período antes de cria, e quanto mais próximo da altura da postura, a massa corporal das fêmeas aumenta drasticamente devido ao crescimento do oviducto e da formação dos ovos, assim como da acumulação de reservas para a incubação (Dawson & Bortolotti, 2000). Se os parasitas afectam a CC, nesta altura do ano os seus efeitos podem ter sido mascarados pela variação da massa corporal resultante deste período.

## CAPITULO 4. CONCLUSÕES

---

No presente estudo reportamos dados sobre as características hematológicas em aves de rapina alojadas no GREFA, um Centro de Recuperação em Madrid, Espanha (40° 28'06.37 N, 3° 50'25.87 O), onde se destacam as diferenças encontradas entre os valores de hematócrito, contagem total de eritrócitos e contagem total de leucócitos existentes entre os diferentes grupos de aves estudadas. As diferenças encontradas entre estes parâmetros hematológicos podem ser justificadas por numerosos factores indutores de stress, como maneo, diferenças de alojamento, agrupamento social e ainda factores fisiológicos, como a idade. No entanto, foram reveladas diferenças estatisticamente significativas relacionadas com a positividade a hemoparasitas, apresentando os grupos de animais mais parasitados alterações dos parâmetros estudados.

Relativamente à pesquisa de hemoparasitas, destacamos a existência de uma taxa de infecção de nível médio tanto na população geral (cerca de 36%), como nas duas ordens de aves de rapina estudadas (cerca de 34% na Ordem Falconiformes e 43% na ordem Strigiformes). O facto de existir uma maior percentagem de rapinas nocturnas infectadas poderá, por um lado, ser consequência de períodos de actividade coincidentes entre as aves e os vectores destes hemoprotozoários e, por outro, consequência da escolha dos seus habitats e locais de nidificação, coincidentes com locais que podem constituir biótopos óptimos para o desenvolvimento destes mesmos vectores. As prevalências de hemoparasitas nas aves de rapina ibéricas variam assim, de forma bastante considerável, dependendo entre outros factores, da espécie de ave e da região geográfica estudada.

É importante realçar que neste estudo foi utilizada uma amostra populacional bastante heterogénea, com indivíduos de várias espécies, provenientes de diferentes pontos de Espanha e com condições clínicas muito distintas, o que pode acentuar as diferenças registadas, tanto no que diz respeito às provas hematológicas realizadas, como no que diz respeito à pesquisa de hemoparasitas. Desta forma, é fundamental analisar os resultados obtidos, tendo presente a grande variação intra e interespecífica que se produz nos mesmos, devido à riqueza de espécies existentes neste grupo zoológico.

Este estudo vem fornecer novos dados e levantar novas questões sobre a influência dos hemoparasitas no estado de saúde das aves de rapina, e sobre a sua implicação na sua ecologia, evolução e conservação. É por isso, muito importante obter novos dados, tanto de indivíduos em liberdade como de aves mantidas em cativeiro em Centros de Recuperação, para determinar a influência de factores indutores de stress no favorecimento de infecções por hemoparasitas e na sua expressão em termos clínicos, tanto a nível hematológico como a nível físico.





## CAPITULO 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- AEMET , Agencia Estatal de Meteorologia (2009). *Octubre, de cálido a extremadamente cálido*. Acedido em Oct.16, 2010, disponível em:  
<http://www.aemet.es/es/noticias/2009/11/climaoctubre09>
- Aguilar, R.F. (2003). Strigiformes (owls). In M.E. Fowler & R.E. Miller (Eds.), *Zoo and Wild Animal Medicine* (5<sup>th</sup> ed) (pp. 213-223). Missouri: Saunders.
- Andrés, R.B. & Munera, J.M.A. (1999). Estudio de la Utilización del Hábitat por parte del Cernícalo Primilla (*Falco naumanni*) en una Colonia de la Comarca de La Mancha. In Consejería del Medio Ambiente – Comunidad de Madrid, *Actas del IV Congreso Nacional sobre el Cernícalo Primilla, Madrid, 29 Octubre – 1 Noviembre 1999*, pp.53-63.
- Ashford, R.W., Wyllie, I. & Newton, I. (1990). *Leucocytozoon toddi* in British sparrowhawks *Accipiter nisus*: observations on the dynamics of infection. *Journal of Natural History*, 24, 1101-1107
- Atkinson, C.T. (2008). Haemoproteus. In C.T. Atkinson, N.J. Thomas & D.B. Hunter (Eds.), *Parasitic Diseases of Wild Birds* (pp. 13-34). Iowa: Wiley-Blackwell.
- Atkinson, C.T. & Forrester, D.J. (1987). Myopathy Associated with Megaloschizonts of *Haemoproteus meleagridis* in a Wild Turkey from Florida. *Journal of Wildlife Diseases*, 23(3), 495-498.
- Bennet, G.F., Caines, J.R. & Bishop, M.A. (1988). Influence os blood parasites on the ody mass of Passeriform birds. *Journal of Wildlife Diseases*, 24(2), 339-343,
- Bennett, G.F., Earli, R.A. & Peirce, M.A. (1992). New species of avian *Hepatozoon* (Apicomplexa: *Haemogregarinidae*) and a re-description of *Hepatozoon neophrontis*. *Systematic Parasitology*, 23, 183-193.
- Bennett, G.F. & Peirce M.A. (1988) Morphological form in the avian Haemoproteidae and an annotated checklist of the genus *Haemoproteus* Kruse, 1890. *Journal of Natural History*, 22, 1683-1696.
- Bennet, G.F., Peirce, M.A. & Ashford, R.W. (1993). Avian Haematozoa: mortality and pathogenicity. *Journal of natural History*, 27, 993-1001.
- Bennet, G.F., Peirce M.A. & Earlé, R.A. (1994a). An annotated checklist of the valid avian species of *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* (Apicomplexa: Haemosporida) and *Hepatozoon* (Apicomplexa: Haemogregarinidae). *Systematic Parasitology*, 29, 61-73.
- Bennet, G.F., Siikamaki, P., Rätti, O., Allander, K., Gustafsson, L. & Squires-Parsons, D. (1994b). Trypanosomes of some Fennoscandian Birds. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89 (4), 531-537.
- Birdlife International (1996). *Action plan for the Cinereous Vulture (Aegypius monachus) in Europe*. Unitek Kingdom: Borja Herdia (Birdlife International, U.K.).
- Bishop, M. & Bennett G.F. (1989). The haemoproteids of the avian order Strigiformes. *Canadian Journal of Zoology*, 67, 2676-2684.

- Bond, C.F. & Gilbert, P.W. (1958). Comparative study of blood volume in representative aquatic and nonaquatic birds. *American Journal of Physiology*, 194, 519-521.
- Bowerman, W.W., Stickle, J.E., Sikarskie, J.G. & Giesy, J.P. (2000). Hematology and serum chemistries of nestling bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*) in the lower peninsula of MI, USA. *Chemosphere*, 41, 1575-1579.
- Brooks, R.L., Bounous, D.I. & Andreasen, C.B. (1996). Functional Comparison of Avian Heterophils with Human and Canine Neutrophils. *Comparative Haematology Internacional*, 6, 153-159.
- Bounous, D.I. (2003). Avian and Reptile hematology. In B. Ballard & R. Cheek (Eds.), *Exotic Animal Medicine for the Veterinary Technician*. (pp.307-312). Iowa: Iowa State Press.
- Campbell, T.W. (1994). Hematology. In B.W.Ritchie, G.J. Harrison & L.R. Harrison (Eds.), *Avian medicine: Principles and Application*. (pp.176-198). Florida: Wingers Publishing.
- Campbell, T.W. (1995) *Avian Hematology and Cytology* (2<sup>nd</sup> Ed.). Iowa: Iowa State University Press.
- Campbell, T.W. (2004a). Hematology of Birds, In M.A. Thrall, *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* (pp 225-258). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins
- Campbell, T.W. (2004b). Hematology of Lower Vertebrates. Acedido em Abr 30, 2010, disponível em:  
<http://www.wildlifehematology.uga.edu/FurtherReading/Campbell%202004.pdf>
- Clark, P. & Raidal, S.R. (2009). Haematological indicators of inflammation exhibited by Australian Falconiformes. *Comparative Clinical pathology*, 18, 1-6.
- Clark, P., Boardman, W. & Raidal, S. (2009). *Atlas of Clinical Avian Hematology*. Oxford: Wiley-Blackwell
- Coles, B.H. (1997). *Avian Medicine and Surgery* (2<sup>nd</sup> Ed.). Oxford: Blackwell Science.
- Davidar, P. & Morton, E.S (1993). Living with parasites: Prevalence of a blood parasite and its effect on survivorship in a Purple Martin. *The Auk*, 110, 109-116.
- Dawson, R.D & Bortolotti, G.R. (2000). Effects of hematozoan parasites on condition and return rates of American kestrels. *The Auk*, 17,(2), 373-380.
- Del Hoyo, J., Elliott, A. & Sargatal, J. (Eds.). (1994). *Handbook of the birds of the world (Volume 2): New world vultures to Guinea-fowl*. Barcelona: Lynx Edicions.
- Donazar, J.A., Hiraldo, F., Delibes, M. & Estrella, R.R. (1989). Comparative food habits of the Eagle Owl *Bubo bubo* and the Great Horned Owl *Bubo virginianus* in six Palearctic and Nearctic beomes. *Ornis Scandinavica*, 20, 298-306.
- Donazar, J.A. (1989). Variaciones geograficas y estacionales en la alimentación del Búho Real (*Bubo bubo*) en Navarra. *Ardeola*, 36(1), 25-39

- Donovan, T.A., Schrenzel, M., Tucker, T.A., Pessier, A.P. & Stalis, I.H. (2008). Hepatic hemorrhage, hemocoelom, and sudden death due to *Haemoproteus* infection in passerine birds: eleven cases. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20, 304-313.
- Everitt, B. S. (1992). *The Analysis of Contingency Tables*, (2<sup>nd</sup> Ed). London: Chapman & Hall.
- Ferrán, A.M. (1996). *SPSS para Windows. Programación y Análisis Estadístico*. Madrid: Mc Graw Hill.
- Forrester, D.J & Greiner, E.C. (1998). *Leucocytozoonosis*. In C.T. Atkinson, N.J. Thomas & D.B. Hunter (Eds.), *Parasitic Diseases of Wild Birds* (pp. 13-34). Iowa: Wiley-Blackwell.
- Fromont, E. (1993). *Hématologie et Parasites Sanguins des Rapaces. Étude chez des Oiseaux en Réhabilitation*. These pour le doctorat vétérinaire. Lyon: École Nationale Veterinaire de Lyon.
- Fudge, A.M. (2000). Avian Complete Blood Count. In A.M. Fudge, *Laboratory Medicine: Avian and Exotic Pets*. (pp.9-18). Philadelphia: W.B. Saunders Company
- Ferguson-Lees, J. & Christie, D.A. (2004). *Rapaces del Mundo*. Barcelona: Omega.
- González, A.G. & Ortí, F.C. (2001). Notas sobre la variación estacional y geográfica de la dieta del búho chico *Asio otus*. *Ardeola*, 48, 75–80.
- García-Ripollés, C., López-López, P., García-Lopéz, F., Aguilar, J.M. & Verdejo, J. (2005). Modeling Nesting Habitat Preferences of Eurasian Griffon Vulture *Gyps Fulvus* in Eastern Iberian Peninsula. *Ardeola*, 52(2), 287-304
- Garvin, M.C. & Greiner, E.C. (2003). Epizootiology of *Haemoproteus danilewskyi* (Haemosporina: *Haemoprotidae*) in Blue jays (*Cyanocitta cristata*) in Southcentral Florida. *Journal of Wildlife Diseases*, 39(1), 1–9.
- Godfrey, R.D., Fedynich, A.M. & Pence, D.B. (1987). Quantification of hematozoa in blood smears. *Journal of Wildlife Diseases*, 23 (4), 558-565.
- Greiner, E.C. & Ritchie, B.W. (1994). Parasites. In B.W. Ritchie, G.J. Harrison & L.R. Harrison (Eds.), *Avian medicine: Principles and Application*. (pp.1007-1029). Florida: Wingers Publishing.
- Gross, W.B. & Siegel, H.S. (1983). Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Diseases*, 27, 972-979.
- Hernández, M., Margalida, A. (2010). Hematology and Blood Chemistry Reference Values and Age-related Changes in Wild Bearded Vultures (*Gypaetus barbatus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 46 (2), 390-400.
- Howlett, J.C. (2000). Clinical and Diagnostic Procedures. In J. Samour (Ed.), *Avian Medicine*, (pp. 28-42)
- Howlett, J.C., Bailey, T.A., Samour, J.H., Naldo, J.L. & D'Aloia, M. (2002). Age related hematologic changes in captive-reared Houbara, White-bellied, and Rufous-crested Bustards. *Journal of Wildlife Diseases*, 38(4), 804–816

- Ihedioha, J.I., Idika, I.K. & Ogamba, G.N. (2008). Changes in the haematological values of avian blood samples stored at varying temperatures for a period of up to 72 hours. *Comparative Clinical Pathology*, 17, 73-79.
- Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (2007). Plano de Acção nacional para a Conservação das aves de Rapina. Acedido em Jul. 2, 2010, disponível em: [http://www.montanhaviva.org.br/arquivos/plano\\_avesderapina.pdf](http://www.montanhaviva.org.br/arquivos/plano_avesderapina.pdf)
- ICNB - Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade (2004). Plano Sectorial da Rede natura - Fichas de caracterização ecológica e de gestão: *Tyto Alba*, Coruja das Torres. Acedido em Jul. 3, 2010, disponível em: [http://www.icnb.pt/propfinal/ Vol.II Valores Naturais/Fichas de caracterização ecológica e de gestão/Fauna/Aves/Tyto alba.pdf](http://www.icnb.pt/propfinal/Vol.II%20Valores%20Naturais/Fichas%20de%20caracteriza%C3%A7%C3%A3o%20ecol%C3%B3gica%20e%20de%20gest%C3%A3o/Fauna/Aves/Tyto%20alba.pdf)
- Junghanns, M.K. (2007). *Aids to Diagnosis*. In B.H. Coles (Ed.), *Essentials of Avian Medicine and Surgery*, (3<sup>rd</sup> ed). (pp.56-102). Oxford: Blackwell.
- Korpimäki, E., Hakkarainen, H. & Bennet, G.F. (1993) Blood parasites and the reproductive success of Tengmalm's owls: detrimental effects on females but not on males? *Functional Ecology*, 7, 420-426.
- Kovach, A.G.B., Szász, E. & Pilmayer, N. (1969). The mortality of various avian and mammalian species following blood loss. *Acta physiologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 35, 109-126.
- Krone, O., Priemer, J., Streich, J., Sömmer, P., Langgemach, T. & Lessow, O. (2001). Haemosporida of Birds of Prey and Owls from Germany. *Acta Protozoologica*, 40, 281 – 289.
- Krone, O., Waldenstöm, J., Valkiūnas, G., Lessow, O., Müller, K., Iezhova, T.A., Fickel, J. & Bensch, S. (2008). Haemosporidian blood parasites in european birds of prey and owls. *Journal of Parasitology*, 94(3), 709-715.
- Kucera, J. (1981). Blood parasites of birds in central Europe. 3. Plasmodium and Haemoproteus [abstract]. *Folia Parasitology*, 28(4), 303-312
- Lehane, M.J. (2005). *The Biology of Blood-Sucking in Insects*, (2<sup>nd</sup> ed). Cambridge: Cambridge University Press.
- Limiñana, R., López-Olvera, J.R., Gallardo, M., Fordham, M. & Urios, V. (2009). Blood chemistry and hematologic values in freeliving nestlings of Montagu's harriers (*Circus pygargus*) in a natural habitat. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 40(4), 687–695.
- López-Gordo, J.L., Lazaro, E. & Fernandez-Jorge, A. (1977). Comparación de las dietas de *Strix aluco*, *Asio otus* y *Tyto alba* en un mismo biótomo de la provincia de Madrid. *Ardeola*, 23, 189-221.
- Loye, J.E. & Zuk. M. (1991) *Bird-parasite Interactions: Ecology, Evolution and Behaviour*. New York: Oxford University Press. Acedido em Jun 11, 2010, from Google books website: <http://books.google.com/books?id=MGCH8UICVeQC&pg=PA19&lpg=PA19&dq=Pathogenicity+and+epizootiology+of+avian+haematozoa>
- Lucas. A.M. & Jamroz, C. (1961). *Atlas of Avian Hematology*. Washington: United States Department of Agriculture.

- Madroño, A., González, C. & Atienza, J.C. (Eds). (2005). *Libro Rojo de las Aves de España*. Madrid: Dirección General para la Biodiversidad – SEO/Birdlife.
- Martínez, J.E. & Calvo, J.F. (2006). *Rapaces diurnas e nocturnas de la Región de Murcia*. Murcia: BIOvisual.
- Martinsen, E.S., Blumberg, B.J., Eisen, R.J. & Schall, J.J. (2008). Avian Hemosporidian Parasites from Northern California Oak Woodland and Chaparral. *Journal of Wildlife Diseases*, 44(2), 260–268
- McFarlane, J.M. & Curtis, S. E. (1989). Multiple concurrent stressors in chicks. 3. Effects on plasma corticosterone and the heterophil:lymphocyte ratio [abstract]. *Poultry Science*, 68, 522-527.
- Mckee, J.S. & Harrison, F.C. (1995). Effects of supplemental ascorbic acid on the performance of broiler chickens exposed to multiple concurrent stressors [abstract]. *Poultry Science*, 74, 1772-1785.
- Mikkola, H. (1995). *Rapaces Nocturnas de Europa*. Lleida: Editorial Perfils.
- Montijano, M.G., López, I.L., Morena, M.A. & Atienza, J.C. (2004). Hematología y electroforesis de proteínas plasmáticas en Cernícalos Primilla (*Falco naumanni*) salvajes. In *Actas del VI Congreso Nacional sobre el Cernícalo Primilla, Zaragoza, 13-15 Febrero 2004*, pp.198-201.
- Muller, M.G., George, A.R. & Mannil, A. (2005) Haematological Values of Gyr Hybrid Falcons. In T. Bailey, J. Chitty, N. Harcourt-Brown & J.Samour (Eds), *Proceedings of the 8<sup>th</sup> European Association of Avian Veterinarians Conference and 6<sup>th</sup> Scientific European College of Avian Medicine and Surgery Meeting, Arles, 24<sup>th</sup> – 30<sup>th</sup> April 2005*, pp.77-84.
- Muñoz, E., Molina, R. & Ferrer, D. (1999). *Babesia shortti* infection in a common kestrel (*Falco tinnunculus*) in Catalonia (northeastern Spain). *Avian Pathology*, 28, 207-209.
- Muñoz, E., Ferrer, D., Molina, R. & Adlard, R. (1999). Prevalence of haematozoa in birds of prey in Catalonia, north-east Spain. *Veterinary Record*, 144, 632-636.
- Nazifi, S., Nabinejad, A., Sepehrimanesh, M., Poorbaghi, S.L., Farshneshani, F. & Rahsepar, M. (2008). Hematology and serum biochemistry of golden eagle (*Aquila chrysaetos*) in Iran. *Comparative Clinical Pathology*, 17, 197-201.
- Ortego, J. (2007). Consequences of eagle owl nest-site habitat preference for breeding performance and territory stability. *Ornis Fennica*, 84, 78-90.
- Ortego, J., Calabuig, G., Cordero, P.J. & Aparicio, J.M. (2007a). Genetic characterization of avian malaria (Protozoa) in the endangered lesser kestrel, *Falco naumanni*. *Parasitology Research*, 101, 1153–1156.
- Ortego, J., Cordero, P.J., Aparicio, J.M. & Calabuig, G. (2007b). No relationship between individual genetic diversity and prevalence of avian malaria in a migratory kestrel. *Molecular Ecology*, 16, 4858–4866.
- Pendl, H. (2006). Morphological Changes in Red Blood Cells of Birds and Reptiles and Their Interpretation. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 61. Acedido em Maio 30, 2010, disponível em:

- Peirce, M.A. (2000). *Hematozoa*. In J. Samour (Ed.), *Avian Medicine*, (pp. 245-252)
- Peirce, M.A. (2005). A checklist of valid avian species of *Babesia* (Apicomplexa: Piroplasmorida), *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* (Apicomplexa: Haemosporida), and *Hepatozoon* (Apicomplexa: Haemogregarinidae). *Journal of Natural History*, 39, 3621–3632.
- Peirce, M.A., Bennet, G.F. & Bishop, M. (1990). The haemoproteids of the avian order Falconiformes. *Journal of Natural History*, 24, 1091-1100.
- Phalen, D.N., Taylor, C., Phalen, S.W. & Bennet, G.F. (1995). Hemograms and Hematozoa of Sharp-shinned (*Accipiter striatus*) and Cooper's Hawks (*Accipiter cooperii*) captured during spring migration in northern New York. *Journal of Wildlife Diseases*, 31(2), 216-222.
- Pinheiro, J.V.B. (2008). Escoamento laminar de fluidos não-Newtonianos em permutadores de calor. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Bragança: Instituto Politécnico de Bragança.
- Polo, F.J., Celdrán, J.F., Peinado, V.I., Viscor, G. & Palomeque, J. (1992). Hematological values for four species of birds of prey. *Condor*, 94, 1007-1013.
- Prescott, I.M., Muñoz, M.Á. & Íñigo J.M. (2008). Valores hematológicos de un grupo de cernícalos primilla (*Falco naumanni*) mantenidos en cautividad en el zoo de Jerez. In J.F. Garcés & M. Corroto (Eds), *Actas del IV Congreso Nacional sobre el Cernícalo Primilla, Madrid, 29 Octubre-1 Noviembre 2009*, pp.118-120.
- Raharimanga, V., Soula, F., Raherilalao, M.J., Goodman, S.M., Sadonès, H., Tall, A., Randrianarivelosia, M., Raharimalala, L., Duchemin, J.B., Arie, F. & Robert, V. (2002). Hémoparasites des oiseaux sauvages à Madagascar. *Archive de l'Institut Pasteur de Madagascar*, 68, 90-99.
- Rebelo, E., Baptista, R., Afonso, A., Monteiro, M., Lapão, N., Sogorb, A., Carvalho, P & Mendonça, P. (2005). Casos de malária em pinguins *Spheniscus demersus* no Jardim Zoológico de Lisboa [abstract]. *Congresso de Ciências Veterinárias, EZN, Vale de Santarém, 13-15 Outubro 2005*, pp.75.
- Rehder, N.B., Bird, D.M., Laguë, P.C & Mackay, C. (1982). Variation in selected hematological parameters of captive Red-tailed hawks. *Journal of Wildlife Diseases*, 18(1), 105-109.
- Santos, N.G., Pereira, M.C., Melo, P.M. & Madeira de Carvalho, L.M. (2008). Pesquisa de hemoprototozoários em aves de rapina (ordens Falconiformes e Strigiformes) em centros de recuperação em Portugal. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 103, 195-200.
- Samour, J. (2000). *Avian Medicine*, (2<sup>nd</sup> Ed). London: Mosby Elsevier.
- Samour, J. (2006). Diagnostic Value of Hematology. In G.J. Harrison & T.L. Lightfoot (Eds.), *Clinical Avian Medicine, Vol II* (pp. 587-609). Florida: Spix Publishing.
- Samour, J. & Peirce, M.A. (1996). *Babesia shortti* infection in a saker falcon (*Falco cherrug*). *Veterinary Record*, 139, 167-168

- Samour, J. & Pendl, H. (2009a). Avian Hematology. In A. Martel, T. Bailey, J. Chitty, N. Harcourt-Brown, J.M. Hatt, & M.Jones (Eds), *Proceedings of the 10<sup>th</sup> European Association of Avian Veterinarians Conference and 8<sup>th</sup> Scientific European College of Avian Medicine and Surgery Meeting, Antwerp, 17<sup>th</sup> – 21<sup>st</sup> March 2009*, pp.513-523.
- Samour, J. & Pendl, H. (2009b). The value of hematology in avian clinical practice. In A. Martel, T. Bailey, J. Chitty, N. Harcourt-Brown, J.M. Hatt, & M.Jones (Eds), *Proceedings of the 10<sup>th</sup> European Association of Avian Veterinarians Conference and 8<sup>th</sup> Scientific European College of Avian Medicine and Surgery Meeting, Antwerp, 17<sup>th</sup> – 21<sup>st</sup> March 2009*, pp.283-289.
- Schimdt, E.M.S., Paulillo, A.C., Santin, E., Ditrich, R.L. & Oliveira, E.D. (2007). Hematological and Serum Chemistry Values for the Ring-necked Pheasant (*Phasianus colchicus*): Variation with Sex and Age. *International Journal of Poultry Science*, 6(2), 137-139
- Sehgal, R.N.M., Hull, A.C., Anderson, N.L., Valkiūnas, G., Markovets, M.J., Kawamura, S. & Tell, L.A. (2006). Evidence for Cryptic speciation of *Leucocytozoon* spp. (Haemosporida, Leucocytozoidae) in diurnal raptors. *Journal of Parasitology*, 92(2), 375-379.
- Sehgal, R.N.M., Jones, H.I. & Smith, T.B. (2001). Host specificity and incidence of *Trypanosoma* in some African rainforest birds: a molecular approach. *Molecular Ecology*, 10, 2319–2327.
- Serrano, D. (2000). Relationship between raptors and rabbits in the diet of Eagle Owls in Southwestern Europe: competition removal or food stress? *Journal of Raptor Research*, 34(4), 305-310.
- Shen, X., Zhang, Z., Jia, B., Tu, Y. & Tian, Y. (2008). Blood Cell Morphology, Some Hematological and Serum Biochemistry Values of Common Kestrel (*Falco tinnunculus*). *Journal of Sustainable Development*, 2(1), 123-128.
- Smith, E.E. & Bush, M. (1978). Haematologic parameters on various species of Strigiformes and Falconiformes. *Journal of Wildlife Diseases*, 14, 447-450.
- Smith, F.M., West, N.H. & Jones, D.R. (2000). The Cardiovascular System. In G.C. Whitrow (Ed.), *Sturkie's Avian Physiology* (5<sup>th</sup> ed) (pp.141-223). California: Academic Press.
- SPSS. (2007). *SPSS Statistics 17.0 Command Syntax Reference*. SPSS Inc.
- Taft, S. J., Rosenfield, R. N. & Bielefeldt, J. (1994). Avian hematozoa of adult and nestling Cooper's hawks (*Accipiter cooperii*) in Wisconsin. *Journal of Helminthological Society of Washington*, 61, 146–148.
- Tella, J. L. (2002). The evolutionary transition to coloniality promotes higher blood parasitism in birds. *Journal of Evolutionary Biology*, 15, 32–41.
- Tizard, I.R. (2009). *Introducción a la Immunología Veterinaria*. (8<sup>a</sup> Edición). Barcelona: Elsevier.
- Tomé, R., Bloise, C. & Korpimäki, E. (2004). Nest-site selection and Nesting success of Little Owls (*Athene noctua*) in Mediterranean woodland and open habitats. *Raptor Research*, 38(1), 35-46.



- Tomé, R., Catry, P., Bloise, C. & Korpimäki, E. (2008). Breeding density and success, and diet composition of Little Owls *Athene noctua* in steppe-like habitats in Portugal. *Ornis Fennica*, 85, 22–32.
- Tomé, R., Santos, N., Cardia, P., Ferrand, N. & Korpimäki, E. (2005). Factors affecting the prevalence of blood parasites of Little Owls *Athene noctua* in southern Portugal. *Ornis Fennica*, 82, 63–72.
- Walberg, J. (2001). White Blood Cell Counting Techniques in Birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 10 (2), 72–76.
- Waldenström J, Bensch S, Kiboi S, Hasselquist D, Ottosson U (2002) Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. *Molecular Ecology*, 11, 1545–1554.
- Wernery, R., Wernery, U., Kinne, J. & Samour, J. (2004). *Colour Atlas of Falcon Medicine*. Hannover: Schlütersche. Acedido em Abr 20, 2010, disponível em: <http://books.google.com/books?id=EryXzFHBKygC&printsec=frontcover&dq=Colour+Atlas+of+Falcon+Medicine>
- Valkiūnas. G. (2005). *Avian malarial parasites and other haemosporidia*. EUA: CRC Press.
- Valkiūnas, G., Bairlein, F., Iezhova, T.A. & Dolnik, O.V. (2004). Factors affecting the relapse of *Haemoproteus belopol'skyi* infections and the parasitaemia of *Trypanosoma* spp. in a naturally infected European songbird, the blackcap, *Sylvia atricapilla*. *Parasitology Research*, (93), 218–222.
- Van Wyk, E., van der Bank, H. & Verdoorn, G.H. (1998). Dynamics of haematology and blood in free living African whitebacked vulture (*Pseudogyps africanus*) nestlings. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 120, 495–508.
- Villegas, A., Sánchez, J.M., Costillo, E. & Corbacho, C. (2002). Blood chemistry and haematocrit of the black vulture (*Aegypius monachus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 132, 489–497.
- Vleck, M.C., Vertalino, N., Vleck, D. & Bucher, T.L. (2000). Stress, corticosterone, and heterophil to lymphocyte ratios in free living Adélie Penguins. *The Condor*, 102, 392–400.
- Votýpka, J., Oborník, M., Volf, P., Svobodová, M. & Lukes, J. (2002). *Trypanosoma avium* of raptors (Falconiformes): phylogeny and identification of vectors. *Parasitology*, 125, 253–263
- Zuberogoitia, I., Zabala, J., Martínez, J.A., Hidalgo, S., Martínez, J.E., Azkona, A & Castillo, I. (2007). Seasonal dynamics in social behaviour and spacing patterns of the Little Owl *Athene noctua*. *Ornis Fennica*, 84, 173–180.

## **ANEXOS**

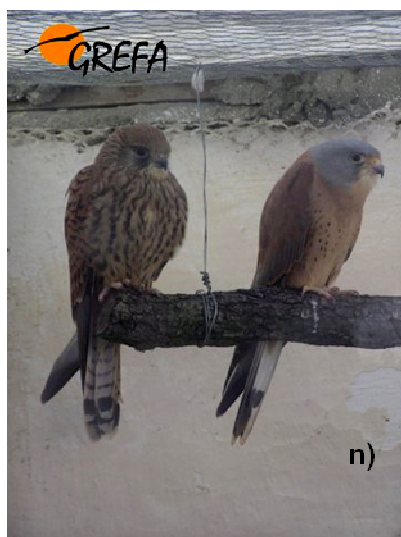
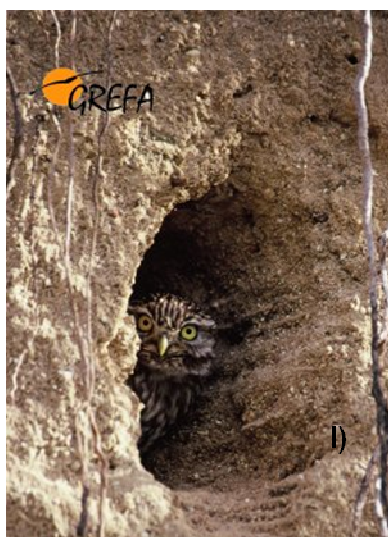


## ANEXO I – ESPÉCIES ESTUDADAS



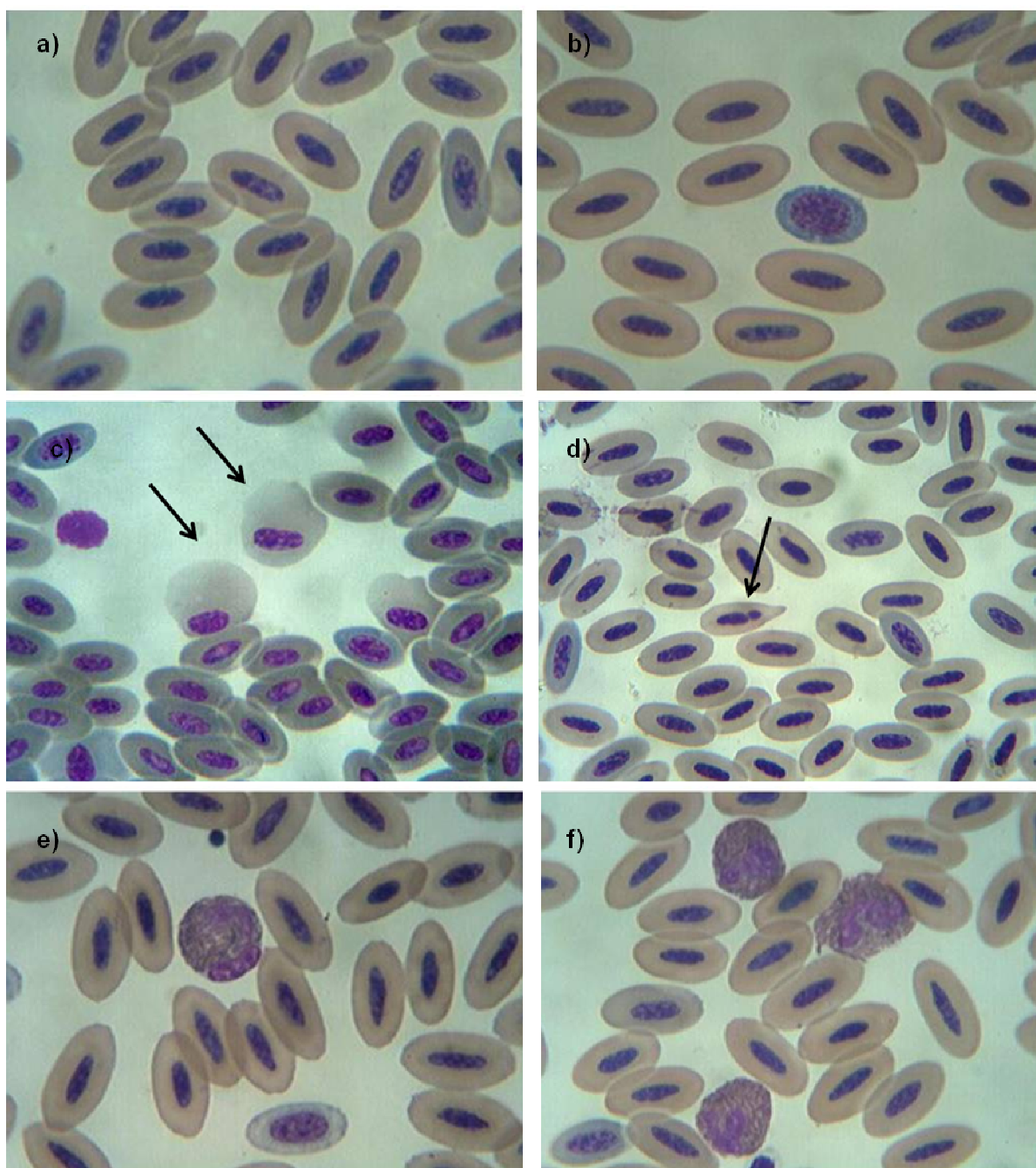
a) Águia real (*Aquila chrysaetos*). b) Abutre negro (*Aegypius monachus*). c) Águia de Bonelli (*Aquila fasciata*). d) Águia cobreira (*Circaetus gallicus*). e) Grifo (*Gyps fulvus*). f) Milhafre real (*Milvus milvus*). g) Águia de asa redonda (*Buteo buteo*)





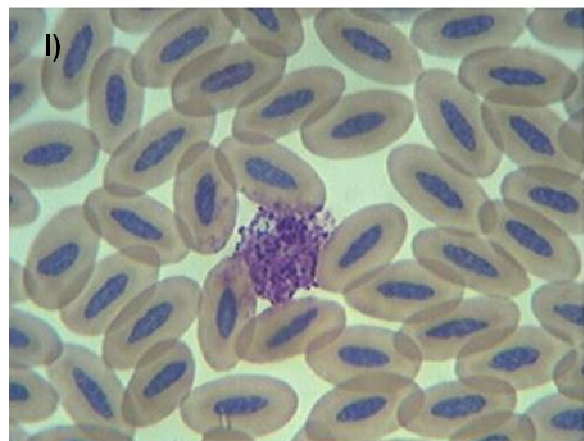
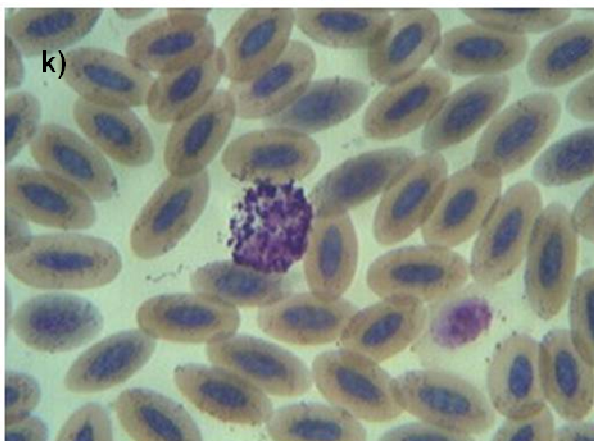
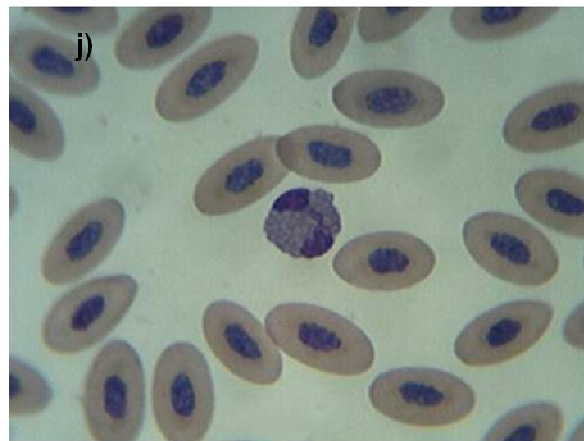
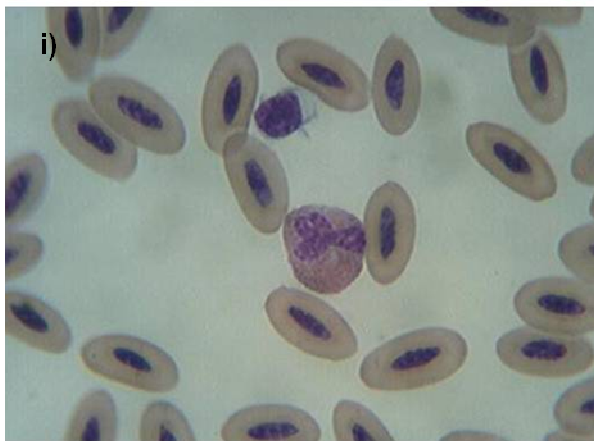
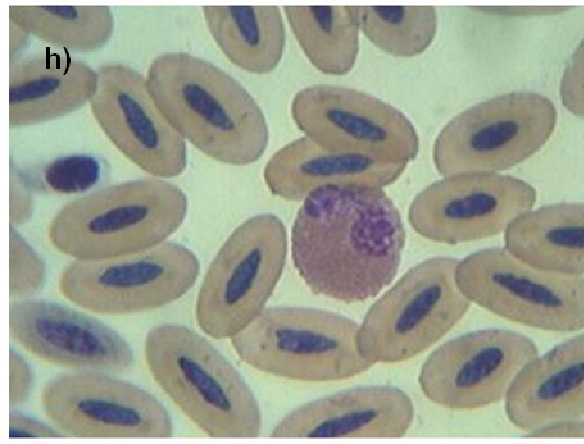
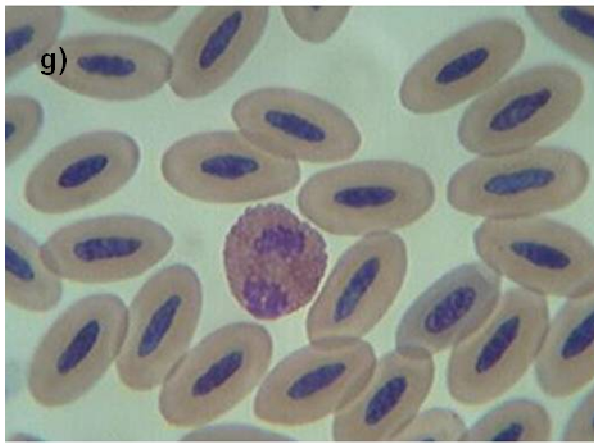
h) Peneireiro comum (*Falco tinnunculus*). i) Coruja das torres (*Tyto alba*). j) Bufo real (*Bubo bubo*).  
k) Coruja do mato (*Strix aluco*). l) Mocho galego (*Athene noctua*). m) Bufo pequeno (*Asio otus*). n)  
Peneireiro das torres (*Falco naumanni*)

## ANEXO II – CÉLULAS HEMÁTICAS EM DIFERENTES ESPÉCIES ESTUDADAS

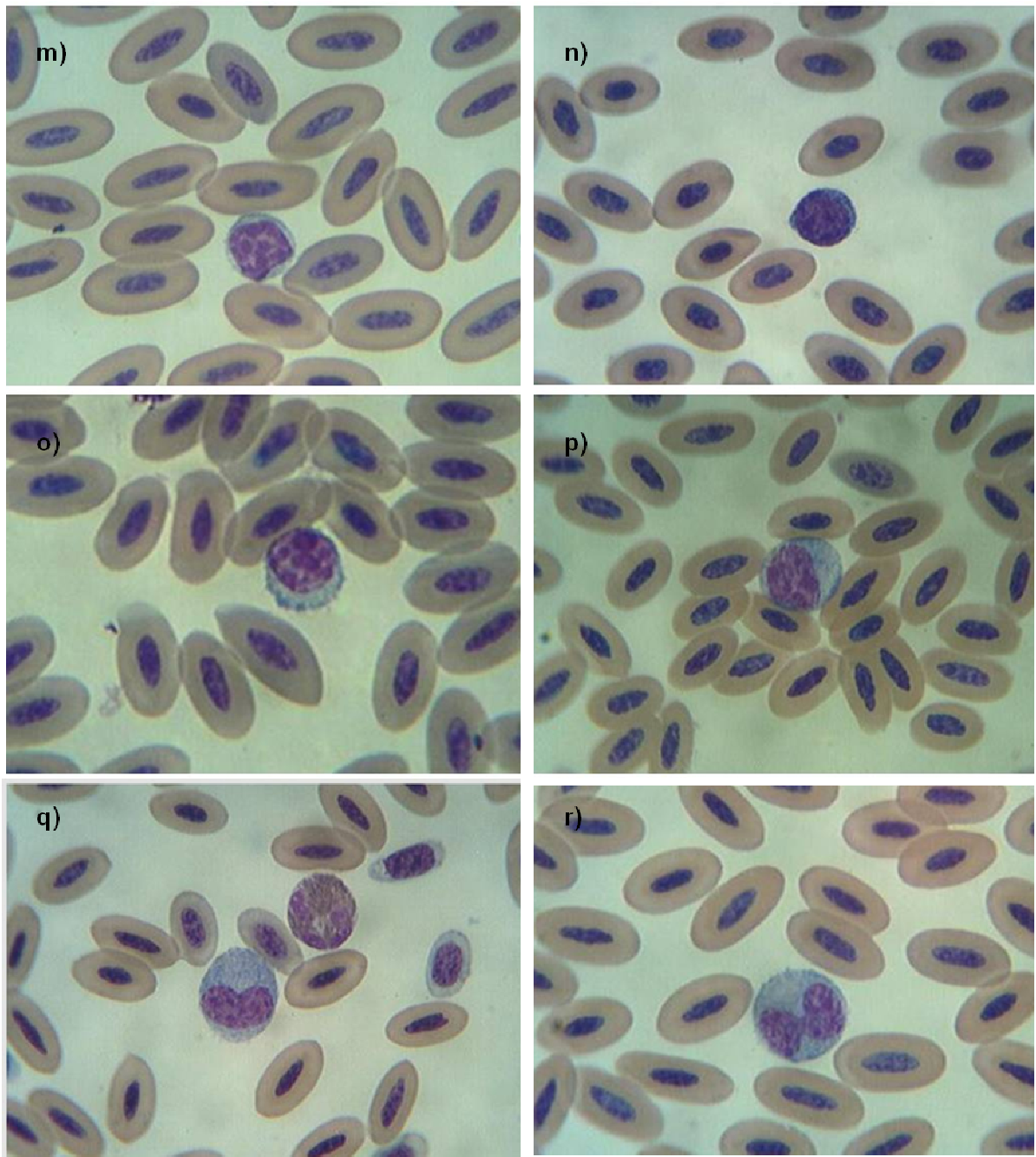


a) Eritrocitos maduros de Abutre negro (*Aegypius monachus*), com um núcleo oval em posição central e citoplasma homogeneamente eosinofílico. b) Eritrocito policromático de Águia real (*Aquila chrysaetos*), com forma menos elíptica, núcleo menos condensado e citoplasma de coloração mais pálida e mais basofílica que os eritrocitos maduros que o rodeiam. c) Poiquilocitos (macroцитos) de Peneireiro das torres (*Falco naumanni*). d) Poiquilocitos de Peneireiro das torres (*Falco naumanni*). e) Heterófilo de Abutre negro (*Aegypius monachus*), com forma redonda irregular, grânulos citoplasmáticos acidófilos e bastante proeminentes e núcleo lobulado e basofílico. f) Heterófilos maduros de Águia real (*Aquila chrysaetos*), com grânulos citoplasmáticos em forma de bastonete distribuídos uniformemente pelo citoplasma. Ampliação de 1000x



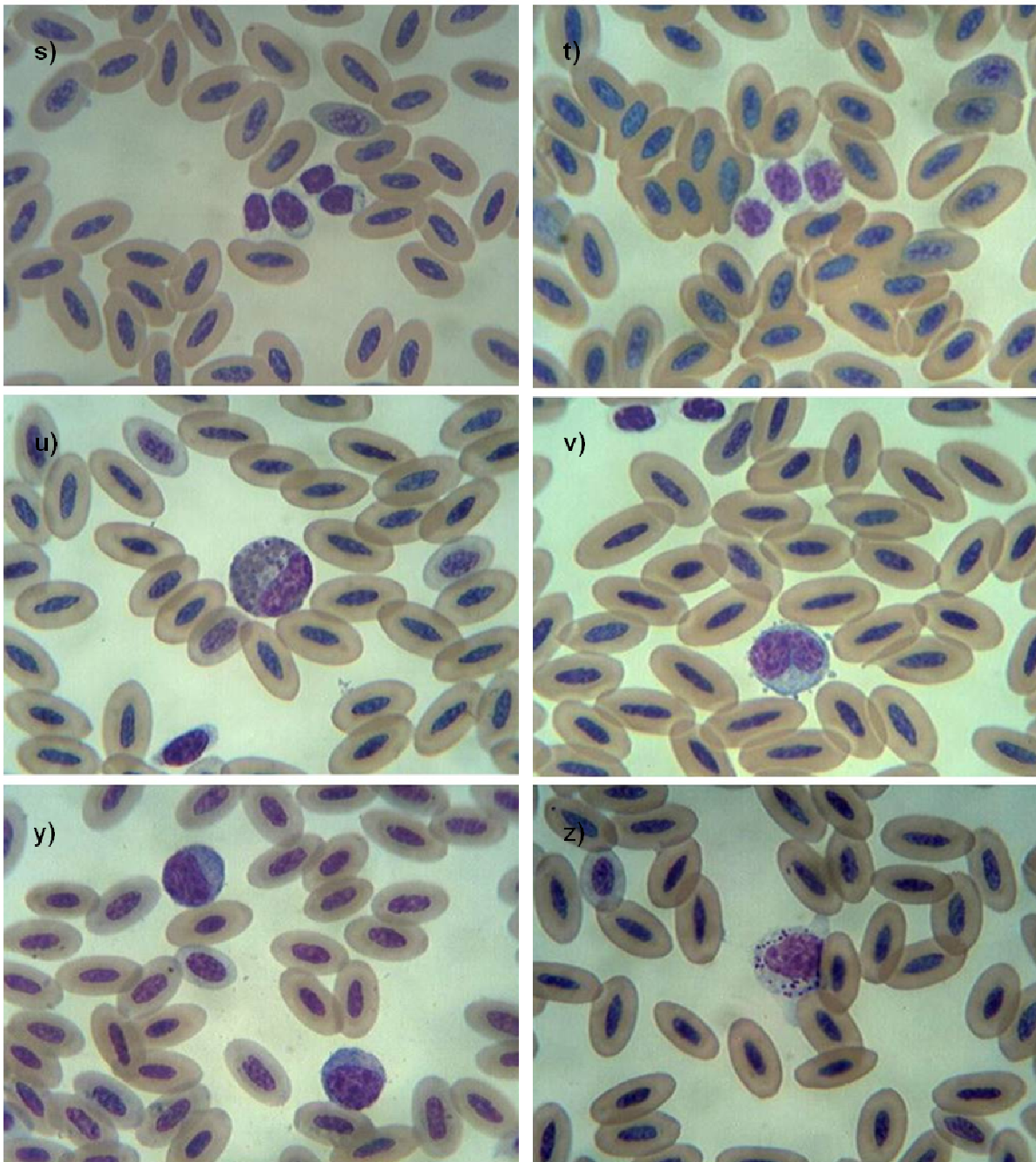


g) Eosinófilo de Águia real (*Aquila chrysaetos*), com núcleo lobulado composto por cromatina basofílica escura e grosseiramente agregada. h) Eosinófilo de Águia de Bonelli (*Aquila fasciata*), com grânulos citoplasmáticos redondos e agregados. i) Eosinófilo de Abutre negro (*Aegypius monachus*), com 3 lóbulos nucleares. j) Eosinófilo de Coruja do mato (*Strix aluco*), com citoplasma corado de um azul claro e pálido e grânulos eosinofílicos claramente redondos. k) Basófilo de Peneireiro das torres (*Falco naumanni*), com citoplasma incolor e grânulos extremamente basofílicos. l) Basófilo de Águia real (*Aquila chrysaetos*), com grânulos citoplasmáticos obscurecendo um núcleo não lobulado. Ampliação de 1000x



m) Linfocito pequeno de Águia real (*Aquila chrysaetos*), com cromatina nuclear reticulada e uma pequena banda de citoplasma ao redor do núcleo. n) Linfocito pequeno de Coruja do mato (*Strix aluco*), com cromatina nuclear extremamente condensada e citoplasma homogêneo e basofílico. o) Linfocito médio de Peneireiro das torres (*Falco naumanni*), com cromatina nuclear reticulada e uma quantidade de citoplasma superior à dos linfócitos pequenos. p) Linfocito grande de Peneireiro das torres (*Falco naumanni*), com uma banda larga de citoplasma rodeando o núcleo. q) Monócito de Abutre negro (*Aegypius monachus*), com núcleo reniforme, cromatina finamente reticular e citoplasma abundante. r) Monócito de Águia real (*Aquila chrysaetos*), com núcleo bilobado e citoplasma com um aspecto granular fino e uma coloração azul/acinzentada. Ampliação de 1000x

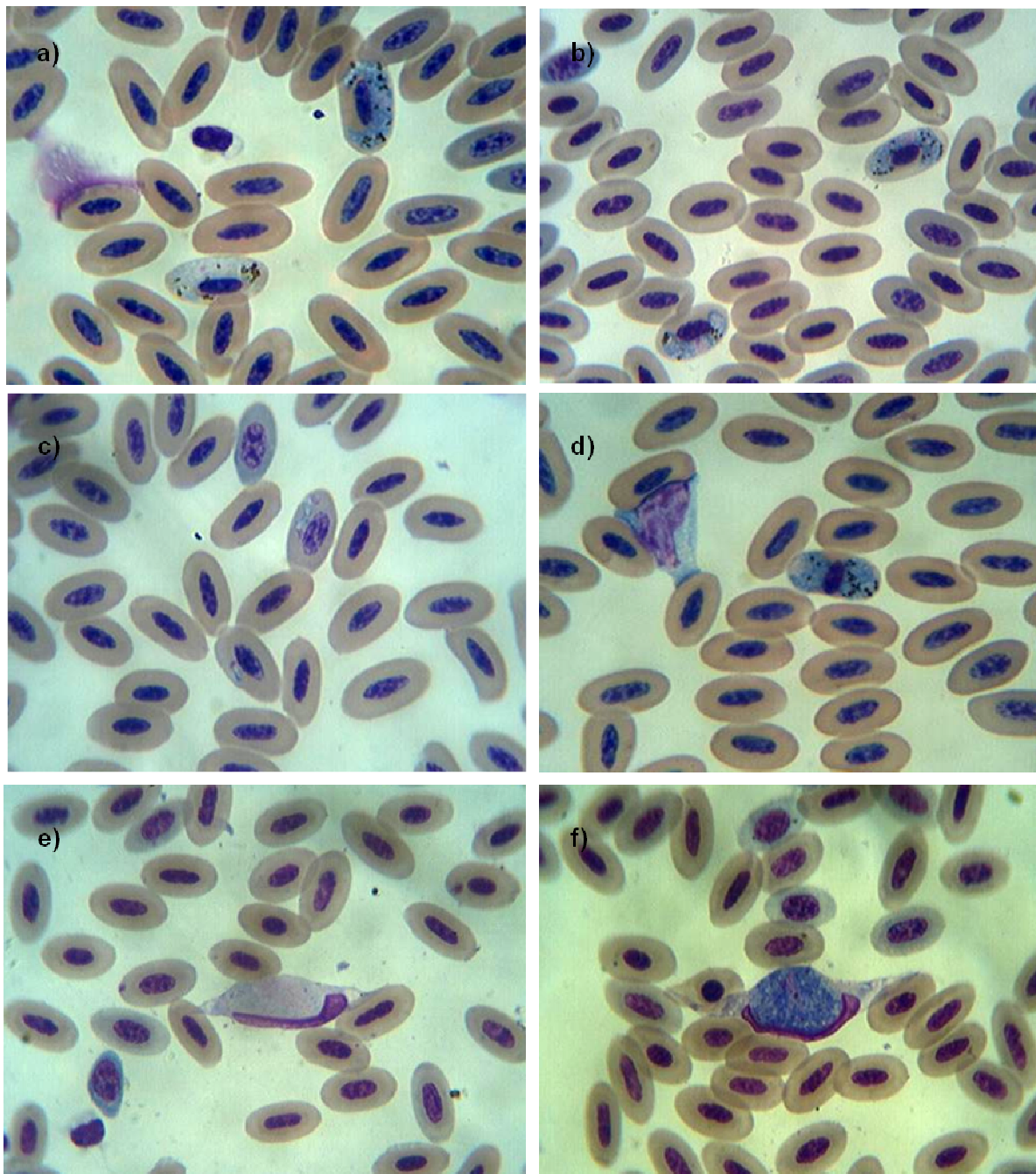




s) Trombocitos de Peneireiro das torres (*Falco naumanni*), com núcleo óvoide, escuro e denso e uma quantidade moderada de citoplasma de coloração acinzentada pálida. t) Trombocitos de Peneireiro das torres (*Falco naumanni*), com núcleo um pouco menos denso que os anteriores. u) Heterófilo tóxico (grau +3) de Abutre negro (*Aegypius monachus*), apresentando basofilia citoplasmática marcada, desgranulação moderada com grânulos grandes formados por fusão e vacuolização do citoplasma. v) Monócito de Abutre negro (*Aegypius monachus*) com prolongamentos citoplasmáticos. y) Células plasmáticas (grandes linfócitos B) de Águia de bonelli (*Aquila fasciata*), com núcleo em posição excêntrica e citoplasma abundante e profundamente basofílico. z) Linfócito de Águia real (*Aquila chrysaetos*) com grânulos azurófilos. Ampliação de 1000x

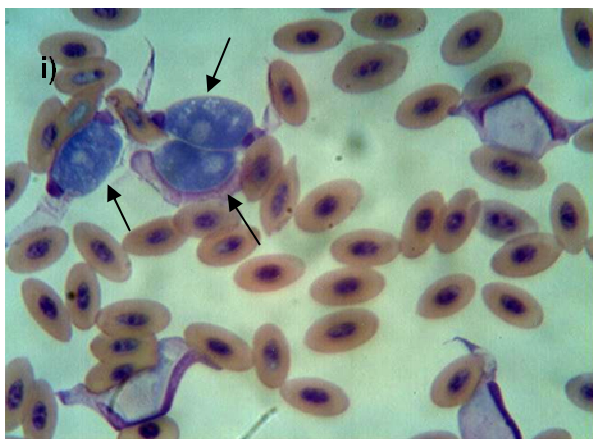
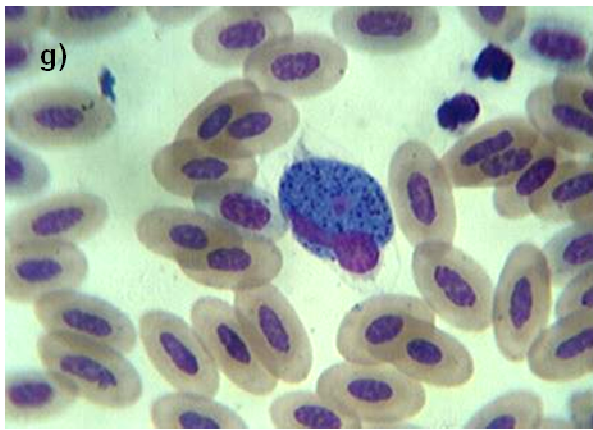
### ANEXO III – DIFERENTES GÊNEROS DE HEMOPARASITAS OBSERVADOS

---



a) Micro e macrogametocito de *Haemoproteus* (*H. tinnunculi*) em Peneireiro vulgar (*Falco tinnunculus*). b) Gametocitos de *Haemoproteus* (*H. tinnunculi*) em Peneireiro das torres (*Falco naumanni*). c) Merontes de *Plasmodium* em Peneireiro das torres (*Falco naumanni*). d) Gametocito de *Plasmodium* em Peneireiro das torres (*Falco naumanni*). e) Macrogamete fêmea de *Leucocytozoon* (*L. ziemanni*) em Bufo pequeno (*Asio otus*). f) Microgametocito masculino de *Leucocytozoon* (*L. Ziemanni*) em Bufo pequeno (*Asio otus*). Ampliação de 1000x





g) Forma redonda de gametocito de *Leucocytozoon* (*L.ziemmani*) em Bufo real (*Bubo bubo*). h) Forma redonda de gametocito de *Leucocytozoon* (*L.ziemmani*) em Bufo real (*Bubo bubo*). i) Numerosos macro e microgametocitos (setas) de *Leucocytozoon* (*L. ziemmani*) em Bufo real (*Bubo bubo*). e) Tripomastigota de *Trypanosoma* (*T.avium*) em Coruja do mato (*Strix aluco*). Ampliação de 1000x

#### **ANEXO IV – COLORAÇÃO DE WRIGHT GIEMSA MODIFICADA POR SAMOUR PARA ESFREGAÇOS DE SANGUE DE AVES**

---

##### Coloração:

- 3 g de corante Wright em pó (Merck® No 1.09278.0025);
- 0.3 g de corante Giemsa em pó (Merck® No 1.09203.0025);
- 5 ml de Glicerina;
- 1000 ml de metanol absoluto (sem acetona) (Merck® No 1.06009.1000);
- Filtrar e armazenar num frasco protegido da luz.
- Estável por várias semanas.

##### Solução tampão pH 6.8 (segundo Weise):

- Dissolver 1 pastilha de tampão em 1 litro de água recém destilada;
- Se necessário agitar.

Nota: A solução tampão, bem cerrada num frasco de vidro, mantém-se estável no mínimo durante 4 semanas.

##### Protocolo de coloração:

- 1º - Colocar os esfregaços secos ao ar num suporte sobre um lavatório ou recipiente;
- 2º - Cobrir os esfregaços com o corante (ver Anexo IV) durante 3 minutos;
- 3º - Juntar igual quantidade de solução tampão pH 6.8 (Merck® No 1.11374.0100) e misturar gentilmente com uma pipeta, até aparecer um brilho verde metálico na superfície;
- 4º - Deixar repousar por 6 minutos;
- 5º - Lavar e cobrir os esfregaços com solução tampão durante 1 minuto para permitir a diferenciação;
- 6º - Lavar abundantemente com solução tampão;
- 7º - Limpar a parte de trás do esfregaço para eliminar o excesso de coloração;
- 8º - Deixar num suporte até que esteja seco;
- 9º - Montar com meio para montagem de microscopia e lamela.

(Samour & Pendl, 2009b)

## ANEXO V – CONSTITUINTES DA SOLUÇÃO DE NATT AND HERRICK'S

---

Cloreto de sódio (NaCl) (Merck® No 567440)	3.88g
Sulfato de sódio (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) (Merck® No 106645)	2.50g
Fosfato de sódio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O) (Merck® No 567550)	2.91g
Fosfato de Potássio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) (Merck® No 529568)	0.25g
Formalina 37%	7.50 ml
Metil Violeta 2B	0.10g
Água destilada	Até perfazer 1000ml

(Samour & Pendl, 2009a)

## ANEXO VI - VALORES HEMATOLÓGICOS DE REFERÊNCIA DAS ESPÉCIES ESTUDADAS

Espécie	N	Hct (%)	TRBC ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	TWBC ( $10^3/\mu\text{l}$ )	Heterófilos	Eosinófilos	Linfócitos	Basófilos	Monócitos	Referência
Águia Real	21	47,00	1,63 $\pm$ 0,11	24,31 $\pm$ 1,97	4,40 $\pm$ 0,22 ( $10^3/\mu\text{l}$ )	2,10 $\pm$ 0,30 ( $10^3/\mu\text{l}$ )	16,81 $\pm$ 0,65 ( $10^3/\mu\text{l}$ )	-	0,99 $\pm$ 0,19 ( $10^3/\mu\text{l}$ )	Nazifi <i>et al.</i> (2008) Ref. não encontrada
Águia de Bonelli	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ref. não encontrada
Águia Cobreira	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ref. não encontrada
Águia de asa redonda	22	40,80	2,94 $\pm$ 0,82	8,04 $\pm$ 1,77	63 $\pm$ 13,10 (%)	16 $\pm$ 13,80 (%)	20 $\pm$ 9,50 (%)	0 $\pm$ 0,70 (%)	0 $\pm$ 1,00 (%)	Hernandez <i>et al.</i> (1990)
Milhafre Real	9	41,00	2,19 $\pm$ 0,44	10,97 $\pm$ 4,16	7,72 $\pm$ 3,80 ( $10^3/\mu\text{l}$ )	1,16 $\pm$ 0,65 ( $10^3/\mu\text{l}$ )	1,34 $\pm$ 0,67 ( $10^3/\mu\text{l}$ )	0,02 $\pm$ 0,06 ( $10^3/\mu\text{l}$ )	0,72 $\pm$ 0,54 ( $10^3/\mu\text{l}$ )	Viana <i>et al.</i> (2010)
Abutre negro	5	39,40	-	-	-	-	-	-	-	Villegas <i>et al.</i> (2002)
Grifo	12	45,50	2,63 $\pm$ 0,32	13,19 $\pm$ 7,32	7,04 $\pm$ 5,02 ( $10^3/\mu\text{l}$ )	0,51 $\pm$ 1,19 ( $10^3/\mu\text{l}$ )	5,02 $\pm$ 2,70 ( $10^3/\mu\text{l}$ )	0,00 ( $10^3/\mu\text{l}$ )	0,06 $\pm$ 0,07 ( $10^3/\mu\text{l}$ )	Polo <i>et al.</i> (1992)
Peneireiro das torres	15	43,90	3,04 $\pm$ 0,47	16,02 $\pm$ 9,26	46,6 $\pm$ 4,80 (%)	1,2 $\pm$ 0,80 (%)	48,8 $\pm$ 5,2 (%)	0 (%)	3,4 $\pm$ 2,5 (%)	Montijano <i>et al.</i> (2004)
Peneireiro vulgar	16	39,94	2,47 $\pm$ 0,55	6,02 $\pm$ 1,42	49,80 $\pm$ 1,03 (%)	0,00 (%)	43,80 $\pm$ 5,44 (%)	6,94 $\pm$ 0,61 (%)	1,80 $\pm$ 1,48 (%)	Shen <i>et al.</i> (2008)
Coruja das torres	10	46,00	2,70 $\pm$ 0,30	16,60 $\pm$ 4,20	8,90 $\pm$ 3,00 ( $10^3/\mu\text{l}$ )	-	5,00 $\pm$ 1,70 ( $10^3/\mu\text{l}$ )	-	-	Samour (2000)
Bufo real	14	39,00	1,90 $\pm$ 0,20	10,80 $\pm$ 4,00	6,90 $\pm$ 3,20 ( $10^3/\mu\text{l}$ )	-	3,80 $\pm$ 1,90 ( $10^3/\mu\text{l}$ )	-	0,00 ( $10^3/\mu\text{l}$ )	Samour (2000)
Mocho galego	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ref. não encontrada
Coruja do mato	14	40,00	2,50 $\pm$ 0,20	6,7 $\pm$ 3,30	3,4 $\pm$ 2,00 ( $10^3/\mu\text{l}$ )	1,27 ( $10^3/\mu\text{l}$ )	3,3 $\pm$ 1,40 ( $10^3/\mu\text{l}$ )	0,20 ( $10^3/\mu\text{l}$ )	0,18 ( $10^3/\mu\text{l}$ )	Samour (2000)
Bufo pequeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ref. não encontrada



## ANEXO VII – POSTER E RESUMO APRESENTADOS NO CONGRESSO DE ANIMAIS EXÓTICOS E DE ZOO DA AEFMV, OUTUBRO DE 2010



### VALORES HEMATOLÓGICOS DE UM GRUPO DE MILHAFRES REAIS (*Milvus milvus*) MANTIDOS EM CATIVEIRO NO GREFA



1M.B. Viana, 2L.M. Madeira de carvalho, 3 F.G.González

<sup>1</sup> GREFA, Madrid, Espanha; <sup>2</sup> Sector de Parasitologia, Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa; <sup>3</sup> Director do Hospital de Fauna selvagem do GREFA, Madrid, Espanha

#### Introdução

O milhafre real (*Milvus milvus*) é uma ave de rapina da família Accipitridae presente na metade noroccidental da província de Madrid. É uma das aves de rapina com distribuição mais restringida, ocorrendo especialmente na Alemanha, França e Espanha, países nos quais se concentra cerca de 90% da população mundial desta espécie. Actualmente classificada como espécie "em perigo" em todo o território espanhol, é considerada desde 1992 como "vulnerável" na Comunidade de Madrid.

Com o objectivo de conhecer os valores hematológicos dos milhafres reais mantidos em cativeiro nas instalações do Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Habitat (GREFA) em Madrid, Espanha, realizou-se a colheita de amostras sanguíneas num grupo de 9 animais adultos e irrecuperáveis, constituído por 7 fêmeas e 2 machos. Todas as aves, mantidas para fins de criação em cativeiro e educação ambiental, foram consideradas clinicamente saudáveis.



#### Materiais e métodos

Depois da época reprodutiva, as aves foram capturadas das suas instalações e posteriormente colocadas sobre a mesa de exploração em decúbito dorsal, sendo manipuladas sob contenção física e visão obstruída por um pano ou um caparão. Todas as aves foram submetidas a uma exploração clínica geral onde se determinou o seu estado de saúde através da avaliação da condição corporal, peso, temperatura rectal, grau de hidratação e estado das penas.

A amostra de sangue foi obtida mediante venopunção da veia cubital. A cada animal foi extraído uma pequena quantidade de sangue (1,5 ml), usada para a realização de um esfregaço sanguíneo por escorregamento e para preencher um tubo de microhematócrito. A restante amostra foi transferida directamente para um tubo de colheita contendo EDTA. As análises hematológicas realizadas incluíram:

- hematócrito (Hct %), determinado por centrifugação do tubo capilar de microhematócrito a 12.000g por 5 minutos;
- contagem total de eritrócitos (TRBC = eritrócitos  $\times 10^3/\mu\text{l}$ ) e contagem total de leucócitos (TWBC = leucócitos  $\times 10^3/\mu\text{l}$ ), determinadas por contagem das células numa câmara de Neubauer Improved, usando a solução de Natt and Herrick's;
- contagem diferencial de leucócitos (células/ $\mu\text{l}$ ) realizada num total de 100 células brancas, em esfregaços sanguíneos corados com a coloração de Wright Giemsa modificada por Jaime Samour, com a ajuda de um contador de células manual.

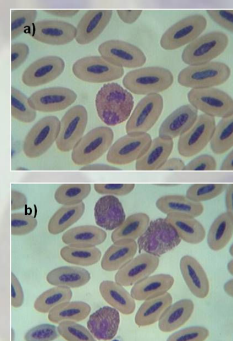
#### Resultados e Discussão

Tabela 1 – Valores hematológicos para milhafres reais em cativeiro

Parâmetros sanguíneos	n	Média $\pm$ desvio	Valores mínimos e máximos
Hct (%)	9	41,00 $\pm$ 6,27	28,00-48,00
TRBC ( $\times 10^9/\mu\text{l}$ )	9	2,19 $\pm$ 0,44	1,50-2,93
TWBC ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	9	10,97 $\pm$ 4,16	6,38-16,94
Heterófilos ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	9	7,72 $\pm$ 3,80	3,38-13,12
Percentagem de WBC		68	53-89
Eosinófilos ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	9	1,16 $\pm$ 0,65	0,40-2,37
Percentagem de WBC		12	3-23
Linfócitos ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	9	1,34 $\pm$ 0,67	0,53-2,24
Percentagem de WBC		13	5-23
Basófilos ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	9	0,02 $\pm$ 0,06	0-0,17
Percentagem de WBC		0	0-1
Monócitos ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	9	0,72 $\pm$ 0,54	0,22-1,86
Percentagem de WBC		7	2-11

Os resultados médios obtidos neste estudo foram resumidos na tabela 1. Estes resultados não puderam ser comparados com outros existentes já que não foi encontrada qualquer referência anteriormente publicada relativa a este mesmos dados.

Os valores de referência determinados para os constituintes hematológicos de milhafres reais clinicamente saudáveis e mantidos em cativeiro, serão bastante úteis na avaliação clínica destes animais, neste e em outros centros de recuperação de fauna selvagem



Fotografias de esfregaços sanguíneos de milhafre real. Em **a)** observa-se um eosinófilo com grânulos citoplasmáticos fortemente acidófilos e de forma arredondada, rodeado de numerosos eritrócitos maduros de forma elíptica e cromatina fortemente condensada. Em **b)** identificam-se três heterófilos com núcleo lobulado, e grânulos citoplasmáticos acidófilos e alongados, entre numerosos eritrócitos maduros. No canto inferior esquerdo da imagem é possível identificar um eritrócito imaturo, com citoplasma mais basófilo, e cromatina menos condensada que os eritrócitos maduros. Coloração de Wright Giemsa modificada. Aumento de 1000x em MOC.

#### Referências:

1. Madroño, A., González, C. & Atienza, J.C. (Eds). (2005). *Libro Rojo de las Aves de España*. Madrid: Dirección General para la Biodiversidad – SEO/Birdlife
2. Samour, J. & Pendl, H. (2009b). The value of hematology in avian clinical practice. In A. Martel, T. Bailey, J. Chitty, N. Harcourt-Brown, J.M. Hatt, & M. Jones (Eds), *Proceedings of the 10th European Association of Avian Veterinarians Conference and 8th Scientific European College of Avian Medicine and Surgery Meeting*, Antwerp, 17th – 21st March 2009, pp.283-289.
3. Howlett, J.C. (2000). Clinical and Diagnostic Procedures. In J. Samour (Ed.), *Avian Medicine*, (pp. 28-42)

## **VALORES HEMATOLÓGICOS DE UM GRUPO DE MILHAFRES REAIS (*Milvus milvus*) MANTIDO EM CATIVEIRO NO GREFA**

M.B. Viana, L.M. Madeira de Carvalho e F.G. González

O milhafre real (*Milvus milvus*) é uma das aves de rapina com distribuição mais restringida, ocorrendo especialmente na Alemanha, França e Espanha, países nos quais se concentra cerca de 90% da população mundial desta espécie. Actualmente classificada como espécie “em perigo” em todo o território espanhol, é considerada desde 1992 como “vulnerável” na Comunidade de Madrid.

Com o objectivo de conhecer os valores hematológicos dos milhafres reais mantidos em cativeiro nas instalações do Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Habitat (GREFA) em Madrid, Espanha, realizou-se a colheita de amostras sanguíneas num grupo de 9 animais adultos e irrecuperáveis, constituído por 7 fêmeas e 2 machos. Todas as aves, mantidas para fins de cria em cativeiro e educação ambiental, foram consideradas clinicamente saudáveis.

Depois da época reprodutiva, as aves foram capturadas dos seus alojamentos e submetidas a uma exploração clínica geral, sendo a amostra de sangue obtida mediante venopunção da veia cubital. A cada animal foi extraído uma pequena quantidade de sangue (1,5 ml), usada para a realização de um esfregaço sanguíneo por escorregamento e para preencher um tubo de microhematócrito. A restante amostra foi transferida directamente para um tubo de colheita contendo EDTA. As análises hematológicas realizadas incluíram hematócrito (Hct), determinado por centrifugação do tubo capilar de microhematócrito a 12,000g por 5 minutos; contagem total de eritrócitos (TRBC) e contagem total de leucócitos (TWBC), determinadas por contagem das células numa câmara de Neubauer Improved, usando a solução de Natt and Herrick's e contagem diferencial de leucócitos, realizada num total de 100 células brancas, em esfregaços sanguíneos corados com a coloração de Wright Giemsa modificada por Jaime Samour, com a ajuda de um contador de células manual.

Os resultados médios obtidos foram de 41% para o Hct,  $2,19 \times 10^6$  eritrocitos/ $\mu$ l para a TRBC e  $10,97 \times 10^3$  leucocitos/ $\mu$ l para a TWBC, sendo que a distribuição das diferentes populações leucocitárias no sangue periférico obedece às seguintes percentagens: 68% de heterófilos, 13% de linfócitos, 12 % de eosinófilos, 7% de monocitos e 0% de basófilos. Estes resultados não puderam ser comparados com outros existentes já que não foi encontrada qualquer referência anteriormente publicada relativa aos parâmetros hematológicos dos milhafres reais.

Palavras-chave: Milhafre real, hematologia, cativeiro, GREFA



**BLOOD PARAMETERS AND HAEMOPARASITES OCURRENCE IN BIRDS OF PREY IN A REHABILITATION CENTER IN SPAIN**

M.B. Viana<sup>1</sup>, DVM, M. Isidoro<sup>1</sup>, DVM, I. López<sup>1</sup>, DVM, J. Mendoza<sup>1</sup>, DVM, L.M. Madeira de Carvalho<sup>3</sup>, DVM, PhD & F.G. González<sup>1</sup>, DVM

<sup>1</sup>GREFA, Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Habitat, Madrid, Spain

<sup>3</sup>Sector of Parasitology, Interdisciplinary Research Centre for Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Technical University of Lisbon, (CIISA/FVM/TUL), 1300-477 Lisbon, Portugal

*Research paper*

**KEYWORDS**

Birds of prey - Blood parameters - Haemoparasites - Rehabilitation center - GREFA

**ABSTRACT**

The occurrence of blood parasites has been investigated in several species of birds throughout Europe. However, studies about haemoprotozoa in raptors held in Spain are still scarce. In order to study the hematologic characteristics and determine the prevalence of blood parasites in birds of prey, blood sampling and hematological tests were carried out in 191 birds admitted to the Wildlife Hospital of Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Habitat, (GREFA), in Madrid, Spain, belonging to nine species of diurnal raptors and five species of nocturnal raptors. This study assessed the possible relation between the presence/absence of these parasites with some variables, both clinical (age, sex, body condition) and hematological (hematocrit (Ht), total red blood cell (TRBC) count and total white blood cell (TWBC) count). *Leucocytozoon*, *Haemoproteus*, *Plasmodium* and *Trypanosoma* genera were identified and important relations between this positivity and some analyzed variables were found. The overall rate of infection was 35%, with a global prevalence rate of 34% in birds of Order Falconiformes and 43% in birds of Order Strigiformes.

## 1 INTRODUCTION

Studies of hematology and survey for haemoparasites in birds have become very important in recent years, specially when related to the management and conservation of endangered species. Several studies, performed throughout Europe, have investigated the prevalence of haemoparasites in different species of birds of prey which play a very important role in ecosystem balance maintenance, mainly due to their position on top of the food chain. However, studies about haematozoa in raptors held in the Iberian Peninsula and particularly in Spain are still scarce. The purpose of the present study was to assess the possible relation between the presence/absence of these parasites with some variables, both clinical (age, sex, body condition) and hematological (Ht, TRBC and TWBC).

## 2 MATERIAL AND METHODS

Between October 2009 and March 2010, 191 raptors admitted to the Wildlife Hospital of GREFA were sampled for hematological tests and blood parasites. This study included nine species of diurnal raptors and five species of nocturnal raptors, grouped in 4 categories: eagles, vultures, kestrels and nocturnal. A volume of 1-1,5ml of blood was collected from the ulnaris, jugular or metatarsal vein, depending on the size of the bird and the physical condition of the patient. A drop of whole blood was used to perform a blood smear and the remaining sample was directly transferred into a commercially available blood tube, containing EDTA. Blood smears were air dried and stained with modified Wright Giemsa stain (Samour & Pendl, 2009). Ht, TRBC, TWBC, differential WBC count and survey for haemoparasites were performed.

## 3 RESULTS

The average values of Ht and TRBC of the four groups, were within the normal range for most species and all species showed average values of TWBC within the normal range for birds with granulocyte differential counts, i.e. between  $5.00$  to  $25.00 \times 10^3/\mu\text{l}$ , with the exception of the Lesser Kestrel (*Falco naumanni*), with a very low TWBC. However, we found highly significant differences between the different groups, both on Ht, TRBC and in TWBC ( $P < 0.001$ ). Although no significant differences were found related to age or gender, highly significant differences were found related to the presence of haemoparasites ( $P < 0.001$ ), in Ht, TRBC and TWBC. The overall rate of infection was 35%, with a global prevalence rate of 34% in birds of Order Falconiformes and 43% in birds of Order Strigiformes. *Leucocytozoon*, *Haemoproteus*, *Plasmodium* and *Trypanosoma* genera were identified. *Plasmodium* was the most prevalent genus in the Order Falconiformes (23%) and *Leucocytozoon* the most prevalent genus on birds of the Order Strigiformes (36%).

## 4 DISCUSSION

The differences between these blood parameters can be justified by numerous stressful factors, such as handling, facilities differences, social group and even physiological factors, such as age. However, significant differences were revealed related to haemoparasites positivity, presenting the most infected animal groups, changes in the researched parameters. This study provided new data and raised new questions about the influence of haemoparasites on raptors health status, and on their involvement in their ecology, evolution and conservation. Therefore, it's very important to obtain new data, both in free living

individuals and captive birds in Rehabilitation Centers, to determine the influence of stress-inducing factors in haemoparasites infections and its expression in clinical terms.

## **5 CITATION INDEX**

1. SAMOUR J and PENDL H. (2009). The value of hematology in avian clinical practice. In MARTEL A, BAILEY T, CHITTY J, HARCOURT-BROWN N, HATT JM. And JONES M. (Eds), Proceedings of the 10<sup>th</sup> European Association of Avian Veterinarians Conference and 8<sup>th</sup> Scientific European College of Avian Medicine and Surgery Meeting, Antwerp, 17<sup>th</sup> – 21<sup>st</sup> March 2009, .283-289.